

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Medicina
Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia

**Arquitecturas axónicas y organización de las
neuronas de proyección multiespecífica del tálamo.
Estudio en el núcleo posterior del ratón.**

TESIS DOCTORAL

César Porrero Calzado

Dirigida por el Doctor

Francisco Clascá Cabré

Madrid, 2016

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL TÁLAMO Y DE LAS PROYECCIONES TALAMOCORTICALES.....	3
2. DIVERSIDAD ESTRUCTURAL DE LAS PROYECCIONES TALAMOCORTICALES.....	5
2.1. Estudios mediante técnicas de marcado poblacional de las neuronas talámicas de proyección.....	7
2.2. Estudios mediante técnicas de marcado de células individuales de las neuronas de proyección talámicas.....	12
3. EL NÚCLEO POSTEROMEDIAL DEL TÁLAMO.....	19
3.1. Definición anatómica.....	19
3.1. Estudios mediante técnicas de marcado poblacional de las proyecciones del Po.....	20
3.1. Estudios de trazado de neuronas individuales.....	26
3.1. Estudios funcionales.....	32
3.3.1. Primeros estudios en el gato e implicación en el dolor.....	32
3.3.2. Estudios en la rata e implicación en el tacto háptico.....	34
3.3.3. El Po en la comunicación transtalámica entre S1 y S2.....	37
3.3.4. El Po como núcleo integrador.....	38
3.3.5. Función de las proyecciones estriatales.....	39
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	43
MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	47
2. PROTOCOLOS GENERALES DE ANESTESIA, CIRUGÍA Y PERFUSIÓN.....	47
3. TÉCNICAS DE TRAZADO POBLACIONAL.....	49
3.1. Técnicas de trazado anterógrado.....	49
3.2. Técnicas de trazado retrógrado.....	51
4. TÉCNICAS DE TRAZADO DE NEURONAS ÚNICAS.....	54
4.1. Consideraciones metodológicas.....	54
4.2. Trazado de neuronas aisladas mediante la inyección de	

pseudoviriones Sindvis.....	55
4.3. Desarrollo de un nuevo método simple y eficiente para transfectar RNA in vivo en neuronas únicas de cerebros adultos.....	57
5. PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO.....	63
5.1. Experimentos de trazado anterógrado.....	63
5.2. Experimentos de trazado retrógrado.....	64
5.3. Experimentos de trazado de neuronas únicas.....	65
6. MÉTODOS DE ANÁLISIS DEL MARCADO DE CONEXIONES.....	66
6.1. Generación de un mapa plano de referencia de la corteza del ratón.....	66
6.2. Análisis de los experimentos de trazado anterógrado.....	67
6.3. Análisis de los experimentos de trazado retrógrado.....	68
6.4. Análisis de los experimentos de neuronas aisladas.....	69
RESULTADOS.....	73
1. EXPERIMENTOS DE TRAZADO ANTERÓGRADO POBLACIONAL.....	73
1.1. Experimentos de trazado con depósitos extensos de BDA.....	73
1.2. Experimentos de trazado con microdepósitos de BDA.....	76
2. EXPERIMENTOS DE TRAZADO DE NEURONAS AISLADAS.....	80
2.1. Experimento con dos neuronas localizadas en las regiones lateral y medial del núcleo.....	83
2.2. Experimento con una neurona localizada en la región ventral.....	83
2.3. Experimento con una neurona localizada dorsomedialmente.....	84
2.4. Experimento con dos neuronas localizadas en dos niveles distintos, rostral y caudal, de la región lateral del núcleo.....	84
3. EXPERIMENTOS DE COLOCALIZACIÓN DE TRAZADORES RETRÓGRADOS.....	85
4. MAPEO DE LAS PROYECCIONES CORTICALES Y SUBCORTICALES DE LAS NEURONAS DEL PO.....	88
4.1. Mapeo de las proyecciones corticales del Po mediante el análisis de múltiples depósitos micropoblacionales de BDArealizados en diferentes regiones del núcleo.....	88
4.2. Mapeo de las proyecciones estriatales del Po mediante el análisis de múltiples depósitos micropoblacionales de BDA.....	93

4.3. Mapeo basado en múltiples depósitos corticales de trazadores retrógrados.....	94
5. ANÁLISIS DE LAS VARICOSIDADES AXÓNICAS.....	98
DISCUSIÓN.....	103
1. CONSIDERACIONES ACERCA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL.....	103
2. PATRONES GENERALES DE PROYECCIÓN CORTICAL DE LAS NEURONAS DEL PO.....	107
3. ORGANIZACIÓN SOMATOTÓPICA GENERAL DE LAS PROYECCIONES.....	107
3.1. Correspondencia del mapa somatotópico del Po con la organización somatotópica de la corteza somatosensorial primaria.....	108
3.2. Organización de las proyecciones del Po fuera del área de S1.....	109
3.3. Organización de las proyecciones subcorticales del Po.....	112
4. PATRONES DE DISTRIBUCIÓN LAMINAR DE LAS PROYECCIONES DEL PO.....	113
5. DIFERENCIAS EN EL TAMAÑO DE LAS VARICOSIDADES AXONALES.....	115
6. CONSIDERACIONES FUNCIONALES.....	116
CONCLUSIONES.....	121
ABREVIATURAS.....	125
BIBLIOGRAFÍA.....	127

INTRODUCCIÓN

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL TÁLAMO Y DE LAS PROYECCIONES TALAMOCORTICALES

El tálamo¹ es una estructura diencefálica par originada, casi en su totalidad, a partir del neuroepitelio de la región alar del segundo prosómero (P2) del cerebro embrionario (Puelles y Rubenstein, 2003). Ha evolucionado de forma independiente en los diversos grupos de vertebrados (Krubitzer y Kaas, 1992; Butler, 1995), alcanzando su máximo desarrollo en los mamíferos. En éstos, la expansión del tálamo se correlaciona con la expansión de la corteza cerebral y, en menor medida, con la del estriado (Herkenham, 1986). El tálamo y la corteza cerebral forman, de hecho, una unidad funcional, al estar conectados de manera directa y recíproca a través de dos masivos sistemas axónicos: las proyecciones talamocorticales y las proyecciones corticotálámicas. De la interacción recíproca entre el tálamo y la corteza cerebral, mediada por estos dos importantes sistemas axónicos, emergen las capacidades sensitivo-motoras y cognitivas características de los mamíferos, así como su ajuste dinámico en los diversos estados conductuales (Sherman y Guillery, 2006; Llinás y Steriade, 2006).

Histológicamente, los tálamos son dos masas de sustancia gris de apariencia heterogénea, cuyas células forman agregados o “núcleos” diferenciables por el distinto tamaño, empaquetamiento o tinción de sus somas neuronales. Karl Friedech Burdach en su obra “Vom Baue und Leben des Gehirns”, publicada en 1822, fue el primero en identificar núcleos en el tálamo humano. Desde entonces, y en base a diferentes criterios químico y citoarquitectónicos, se han propuesto sucesivas nomenclaturas y parcelaciones del tálamo en diversas especies (Paxinos y Franklin, 2001; Jones 2007). Esta organización nuclear, lejos de ser azarosa, obedece a determinantes genéticos, de forma que las relaciones topológicas básicas entre los diferentes núcleos están conservadas en todos los mamíferos. A ella subyacen, además, importantes implicaciones funcionales, ya que estos agregados celulares o “nucleos” coinciden, de forma bastante precisa, con la distribución de las conexiones aferentes que el tálamo recibe (Jones).

En cuanto a su composición neuronal, el tálamo es una estructura bastante homogénea. Dependiendo de la especie, entre el 80 y el 98% de sus células nerviosas son neuronas glutamatérgicas de proyección (neuronas talámicas de proyección -NTPs-), siendo el

resto interneuronas gabaérgicas (Aracelli y cols., 1997). Debido a su origen embrionario común, todas las NTPs presentan patrones similares de expresión génica (Murray et al., 2007; Nakagawa y Shimogori, 2012) y comparten características fenotípicas tales como la neurotransmisión glutamatérgica, la expresión de determinados canales iónicos y la morfología somatodendrítica general. Así, Las NTPs poseen un árbol dendrítico multipolar o ligeramente bipolar confinado en el núcleo donde se encuentra el soma (Kolliker, 1980s). Este árbol dendrítico suele estar formado por entre 3 y 15 dendritas radiales que se dividen pronto en un número variable de ramas, también radiales. Todas estas dendritas poseen espinas dendríticas cortas (revisado en Jones, 2007). En cuanto a la expresión de canales iónicos, las NTPs se caracterizan por tener una gran densidad de canales T de Ca^{2+} en su compartimento somatodendrítico, que les van a conferir la capacidad para transmitir información de forma distinta en función del nivel de excitación/inhibición que reciben (Llinás y Steriade, 2006)

En lo que a sus axones se refiere, las NTPs también van a compartir algunas características conectivas básicas: todas ellas proyectan ipsilateralmente y de forma topográfica al núcleo reticular pretalámico (RpTN) (Jones, 1975) y muchas lo hacen, a su vez, a estructuras telencefálicas subcorticales, como el núcleo entopeduncular, la amígdala (Day-Brown y cols., 2010; Doron y Ledoux, 1999; Turner y Herkenham, 1991; Ledoux y cols., 1990; Linke y cols., 2000) el claustró (Carey y Neal, 1985; Kaufman y Rosenquist, 1985) y, sobre todo, el estriado (Galvan y Smith, 2011; Groenewegen y Berendse, 1994). No obstante, su principal diana sináptica es, salvo algunas excepciones², la corteza cerebral. Es por ello que las NTPs son conocidas, generalmente, como neuronas talamocorticales (NTC).

Las proyecciones talamocorticales (TC) constituyen la vía de entrada a la corteza cerebral de toda la información sensorial intero- y exteroceptiva (a excepción del olfato), así como de información motora re-entrante desde los ganglios basales y desde el cerebelo. Estas entradas van a determinar, en gran medida, la identidad funcional de las áreas corticales que inervan, mientras que su modulación representa un mecanismo fisiológico fundamental para la regulación de la atención y de los estados de sueño y vigilia. Por otra parte, las proyecciones talamoestriales participan en la modulación de los procesos de aprendizaje y comportamiento mediados por los ganglios basales

En los últimos años se ha propuesto que una parte importante de las proyecciones talamocorticales podrían estar actuando como vías de relevo de información entre áreas corticales, constituyendo así una vía paralela de comunicación cortico-tálamo-cortical (Theyel y Sherman., 2010). Además, se ha demostrado que algunas de estas proyecciones serían responsables de la sincronización de las oscilaciones de membrana y el control del flujo de información entre distintas poblaciones neuronales pertenecientes a determinadas redes corticales de procesamiento.

Pese a su relevancia, la diversidad funcional de las proyecciones talamocorticales se sustenta sobre una poco conocida y mal sistematizada diversidad de arquitecturas axónicas. Sin embargo, el conocimiento estructural preciso y la correcta sistematización de estas proyecciones es indispensable para comprender y modelizar los circuitos y la dinámica de las redes talamocorticales.

2. DIVERSIDAD ESTRUCTURAL DE LAS PROYECCIONES TALAMO-CORTICALES

Desde que en la segunda mitad del siglo XIX Jules Luys describiese al tálamo como una estructura de relevo de información ascendente desde la periferia sensitiva a la corteza cerebral (“*that the ^[SEP]optic thalamus, with the isolated grey ganglions of ^[SEP]which it is composed, represents a place of passage and ^[SEP]reinforcement for excitations radiated from the sensorial periphery*”) (Luys, 1865), ha prevalecido la idea de que la función primordial del tálamo era la de filtrar y transmitir información, fundamentalmente de carácter sensorial, a través de proyecciones unívocas que, desde un núcleo talámico concreto, invocaban focal, densa y topográficamente, un área concreta de la corteza cerebral (Mumford, 1995). Sus arquitecturas conectivas simples, de fácil trazado, y el hecho de que transmitiesen información sensorial procedente de vías claramente segregadas y fácilmente estimulables, convirtieron a estas proyecciones (y a los núcleos primarios de relevo donde se originan) en el modelo predilecto de anatomistas y fisiólogos para estudiar y sistematizar las relaciones entre el tálamo y la corteza cerebral. Sin embargo, ya desde los estudios de Lorente de Nó con la técnica de Golgi (1922) se conocía la existencia de otros tipos de proyecciones talámicas que, a diferencia de las primeras, parecían dirigirse a regiones amplias de la corteza cerebral

sin mostrar una topografía clara. El difícil abordaje experimental de estas proyecciones con las técnicas clásicas de trazado poblacional y de estimulación (Jasper y cols., 1949; Nashold y cols., 1955) y su aparente inespecificidad determinaron que su estudio quedase relegado a un segundo plano.

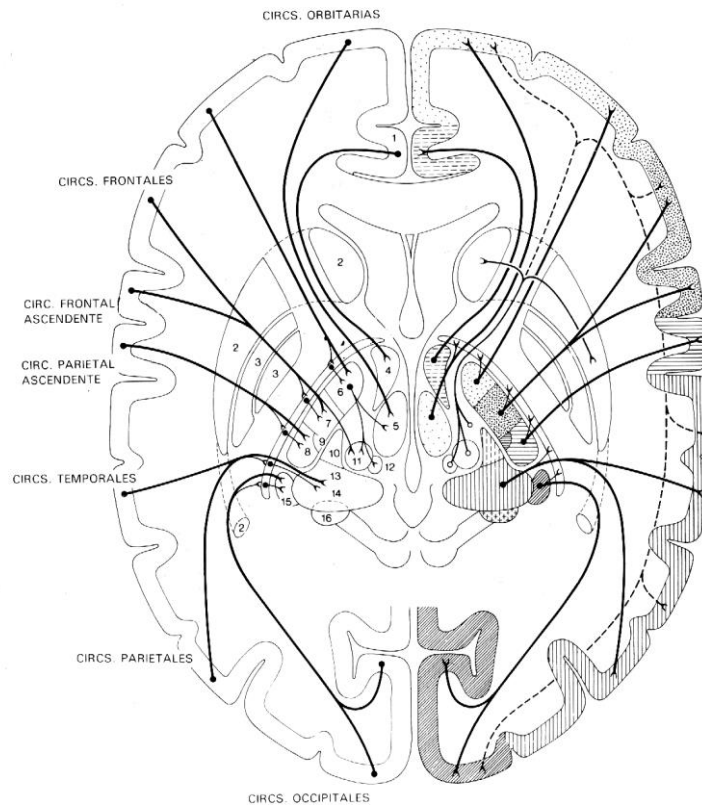


FIGURA 1: Esquema global de la distribución tangencial de los axones talamocorticales (hemisferio derecho) y de las vías corticotalámicas (hemisferio izquierdo) del cerebro humano. Observese que en el esquema se representa un axón “inespecífico” que inerva el estriado y continúa para ramificarse en varias áreas corticales. Se puede observar también cómo el origen de este axón se ubica en los núcleos intralaminares. Tomado de Nieuwenhuys y cols. (1982).

En los últimos diez años, la mejora de las técnicas clásicas de trazado poblacional y el desarrollo de nuevas y potentes técnicas de trazado de neuronas aisladas, han revelado una insospechada diversidad de arquitecturas axónicas fuera de los núcleos primarios de relevo.

2.1. Estudios mediante técnicas de marcado poblacional de las neuronas talámicas de proyección

Rafael Lorente de Nó fue el primero en identificar, utilizando la técnica de impregnación argéntica desarrollada por Camillo Golgi, dos tipos de axones de supuesto origen talámico en la corteza cerebral de ratones postnatales (Lorente de Nó, 1922; 1938). Aquellos que denominó “específicos” terminaban focalmente en un área concreta de la corteza cerebral, arborizando profusamente en la capa 4. Los “inespecíficos”, por el contrario, parecían inervar diferentes regiones corticales mediante la emisión de ramas colaterales en la sustancia blanca. Además, estos axones arborizaban de forma mucho menos profusa en todas las capas, incluida la capa más superficial (capa 1)

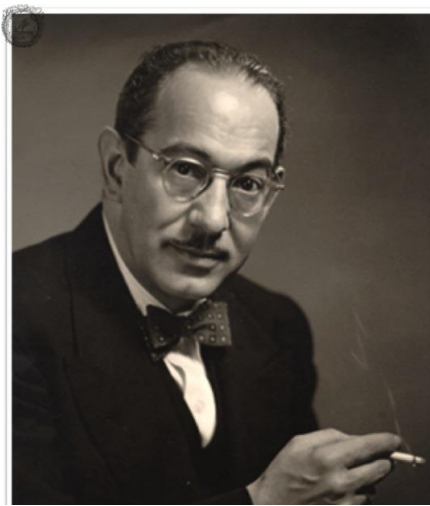
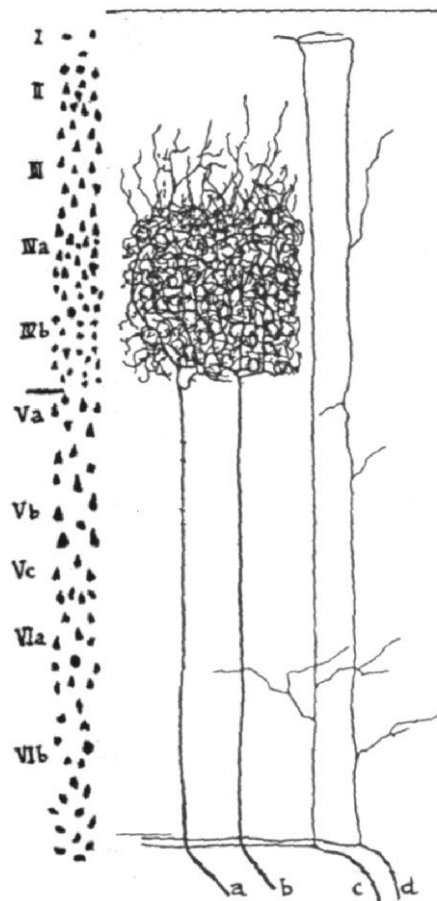


FIGURA 2: Representación realizada por Lorente de Nó de la distinta distribución laminar de los axones talamocorticales específicos (a y b) e inespecíficos (c y d) en la corteza cerebral de ratones postnatales. Observese cómo los axones inespecíficos que entran en la corteza son ramas colaterales del axón principal, que continua su recorrido por la sustancia blanca



Los estudios posteriores, basados en técnicas de degeneración retrógrada, fueron especialmente útiles para profundizar en el conocimiento de las proyecciones específicas, ya que al lesionar una determinada área cortical se producía degeneración en aquel núcleo talámico que la inervaba de forma exclusiva. De este modo, se pudo esclarecer la topografía general de las proyecciones talamocorticales específicas (Le Gros Clark, 1932; Walker, 1935, 1937; Waller, 1934; Rose y Woolsey, 1949). También se observó que las neuronas de algunos núcleos sólo degeneraban cuando se lesionaban regiones muy amplias de la corteza. Se supuso que estas neuronas serían el origen de las proyecciones “inespecíficas” descritas por Lorente de Nó. Por último, se supuso que algunas regiones corticales (temporales sobre todo), eran “atalámicas” al no apreciarse degeneración en ningún núcleo talámico tras ser lesionadas (Frontera, 1956). A raíz de estos experimentos, Rose y Woolsey (1949) rebautizaron a las proyecciones específicas como “esenciales, y a las inespecíficas como “de refuerzo”.

Estas primeras observaciones anatómicas fueron de gran utilidad para los primeros electrofisiólogos, ya que les permitió explicar los dos tipos de respuesta que habían observado en la corteza cerebral del gato después de estimular los núcleos talámicos (Morison y Dempsey, 1942; Dempsey y Morison, 1942b). Así, las proyecciones talamocorticales específicas explicarían la respuesta “aumentante”, que era evocada en áreas restringidas de la corteza por una estimulación repetitiva de baja frecuencia en los núcleos primarios de relevo sensorial. Por otra parte, las proyecciones “inespecíficas” explicarían la respuesta “reclutante”, que se obtenía en áreas extensas de la corteza después de estimular regiones cercanas a los núcleos intralaminares (Jasper, 1949, 1954). A raíz de estos estudios se estableció, por tanto, que las proyecciones inespecíficas debían tener su origen en los núcleos intralaminares, y que su principal diana sináptica era la capa 1 cortical.

Con la introducción a partir de los años 70 de diferentes técnicas de trazado axonal, esta primera clasificación dicotómica de las proyecciones talamocorticales dio paso a nuevas sistematizaciones que intentaron catalogar una diversidad fenotípica creciente. Esta diversidad fenotípica se reflejaba en la distinta dispersión tangencial de los axones en la

corteza cerebral, en la existencia de distintos patrones laminares de arborización cortical, y en la innervación adicional de estructuras subcorticales, como el estriado.

Los primeros métodos de transporte axonal anterógrado permitieron estudiar los patrones de distribución tangencial y laminar de las proyecciones talamocorticales desde diferentes núcleos talámicos. Especialmente destacables a este respecto fueron los experimentos realizados por Miles Herkenham (1978, 1979, 1980, 1986) mediante microinyecciones talámicas selectivas de aminoácidos tritiados. Basándose en los distintos patrones de innervación observados, Herkenham definió tres tipos de núcleos en el tálamo de la rata: los núcleos “específicos”, como el ventral posterior (VP), que arborizaban en las capas 4 y 3b y, en menor medida, en la capa 6 de una pequeña región cortical. Los núcleos “intralaminares”, como el central medial (CeM), que innervaban de forma dispersa las capas profundas de regiones corticales extensas y, además, el estriado. Los núcleos “paralaminares” o “1+”, como el núcleo posterior (Po), que innervaban la capa 1 cortical y, en la mayoría de los casos, otras capas adicionales que variaban en función del área cortical.

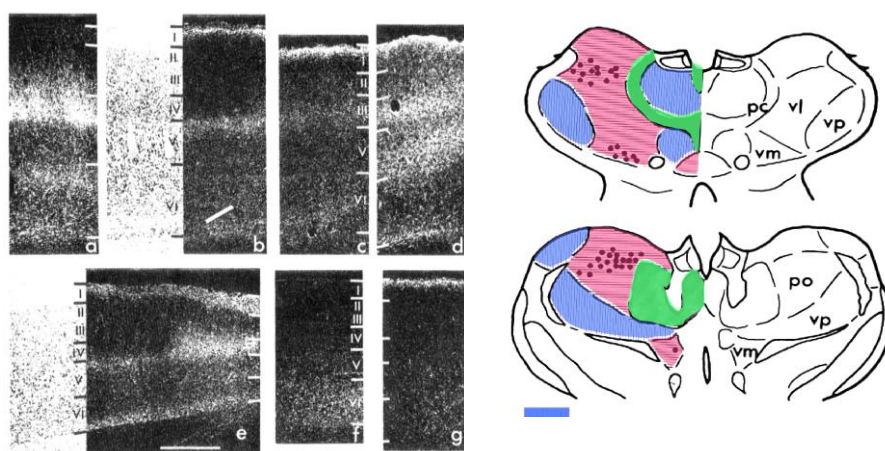


FIGURA 3: Patrones de innervación de los 3 tipos de núcleos definidos por Herkenham.

A la izquierda se muestra la distribución del marcado autorradiográfico en secciones coronales de la corteza tras inyectar los núcleos ventral posterior (a), central lateral (b) y posterior (c). A la derecha se representa de forma esquemática el origen de las diferentes proyecciones en el tálamo. Modificado de Herkenham (1986).

De forma paralela y mediante la aplicación de trazadores retrógrados en la corteza cerebral del gato, Machi y cols. (1983) diferenciaron cuatro tipos de núcleos talámicos

en función de la dispersión tangencial de sus proyecciones corticales (Figura 4): un primer grupo estaría representado por núcleos como el VP o el geniculado medial (NGM) que proyectaban densamente a una única región cortical. El segundo grupo incluiría aquellos núcleos que proyectaban densamente a una región cortical y de forma menos densa a otra. Entre ellos estarían el lateral dorsal (LD) o el lateral posterior (LP). El tercer grupo estaba formado por los núcleos que proyectaban de forma preferente a varias áreas corticales y de forma dispersa a otras regiones. En esta categoría se incluirían núcleos como el ventral medial (VM) o los intralaminares. El cuarto grupo lo formaban núcleos como el Po, que proyectaban de forma dispersa a varias áreas sensoriales (Macchi, 1983, Rausell y Jones, 1995).

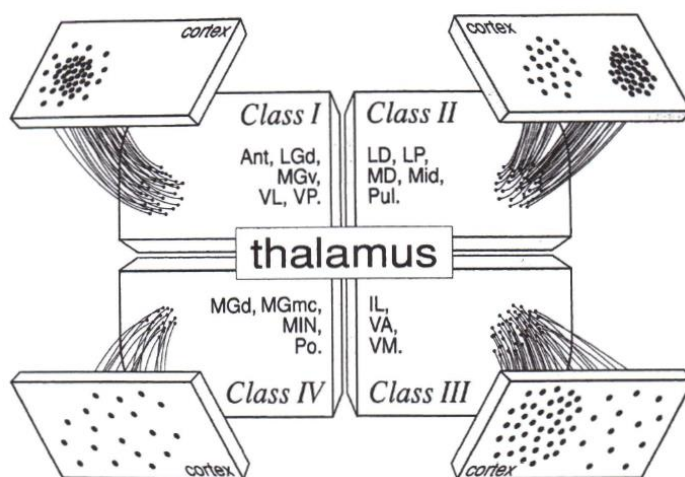


FIGURA 4: Clasificación de los núcleos talámicos en función de la dispersión de sus axones en la corteza. Tomado de Macchi (1983)

En cuanto al patrón laminar, mediante el depósito de trazadores retrógrados en diferentes capas corticales, se pudo observar que el tamaño del soma de las neuronas que inervaban la capa 1 en algunos núcleos era menor que el de las neuronas que inervaban la capa 4. Esto se tomó como una evidencia de que debían constituir dos poblaciones distintas. Además, las neuronas proyectantes a capa 1 se localizaban en algunos subnucleos y, otras veces, aparecían entremezcladas con las que proyectaban a capas profundas. Avendaño Rausell y Reinoso (1990), propusieron que estas neuronas formarían el “sistema proyectante a capa 1” o “LIPS”.

Unos años más tarde, Edward Jones propuso una nueva clasificación de las neuronas talamocorticales, basada esta vez en los resultados obtenidos tras estudiar las conexiones eferentes y aferentes de algunos núcleos de relevo sensorial de macacos, y correlacionar los patrones observados con la expresión de citocromo oxidasa y de

estas proyecciones inervaban la corteza cerebral de manera muy convergente/divergente.

La introducción en los años 80 de trazadores axonales anterógrados de gran sensibilidad, como la leucoaglutinina de *Phaseolus vulgaris*, los dextranos o la subunidad B de la toxina colérica y, mas recientemente, de vectores virales adenoasociados codificantes para proteínas fluorescente (REF), ha permitido visualizar directamente y con gran detalle los axones talamocorticales que se originan en diferentes núcleos talámicos. La rata ha sido, con diferencia, la especie más estudiada con estas técnicas. En ella se han estudiado las proyecciones talamocorticales de los núcleos anteriores (Shibata, 1993a, 1993b; van Groen y cols., 1999), el lateral dorsal (van Groen y Wyss, 1992), ventral medial (Arbuthnott y cols., 1990; Desbois y Villanueva, 2001), posterior (Lu y Lin, 1993), ventral posterior (Lu y Lin, 1993), los núcleos de la línea media y los intralaminares (Wouterlood y cols., 1990; Berendse y Groenewegen, 1991; confirmandose en gran medida los patrones laminares y tangenciales previamente descritos. Además, la posibilidad de realizar depósitos mas pequeños y restringidos en distintas regiones de un mismo núcleo, ha permitido observar que las proyecciones talamocorticales “difusas” de determinados núcleos considerados “inespecíficos” son menos extensas y mas topográficas de lo previamente descrito (Berendse y Groenewegen, 1991; Rubio-Garrido y cols., 2009). Además, estas proyecciones parecen ser también heterogeneas en cuanto a sus patrones laminares (Sherman)

2.2. Estudios mediante técnicas de marcado de células individuales de las neuronas de proyección talámicas

Como hemos visto, las diferentes técnicas de trazado de poblaciones neuronales han permitido demostrar que la mayoría de los núcleos talámicos proyectan de forma divergente y heterogénea a distintas regiones corticales. Además, muchos de estos núcleos también proyectan a estructuras telencefálicas subcorticales, como el estriado. Sin embargo, estas técnicas carecen de la resolución necesaria para determinar qué fenotipos axónicos están formando estas proyecciones, o si la divergencia de las proyecciones desde un núcleo talámico concreto se debe a la existencia de poblaciones

heterogéneas de neuronas con diferentes patrones unívocos de proyección, o bien se debe a la divergencia de axones individuales que, mediante ramas colaterales, inervarían diferentes regiones corticales y/o subcorticales.

Los axones inespecíficos descritos por Lorente de No supusieron la primera evidencia de la existencia de NTPs que, mediante la emisión de colaterales axónicas en la sustancia blanca, inervaban distintas regiones corticales. Sin embargo, aunque la técnica de impregnación argéntica que utilizaba le permitió observar de forma directa la existencia de numerosas colaterales axónicas en la sustancia blanca, así como algunos detalles de su arborización cortical, no le fue posible seguir el axón hasta el tálamo, ni tampoco trazar la mayor parte de la arborización axonal dentro de la propia corteza.

Las técnicas de doble trazado retrógrado parecían ser, en un principio, el método idóneo para estudiar el origen y la prevalencia en el tálamo de estas neuronas. Sin embargo, aunque se pudo observar cómo algunas neuronas de determinados núcleos inervaban simultáneamente diferentes áreas somatosensoriales (Spreafico), visuales (REF) o auditivas (REF) próximas, en la mayoría de los experimentos se encontró que el número de neuronas doblemente marcadas era muy escaso (<5%) (Machi...). Esto llevó a algunos autores a concluir que la colateralización en las neuronas de proyección suponían una excepción dentro del tálamo (Kishan et al., 2008), lo cual parecía contradecir la aparente abundancia de colaterales axónicas observada mediante la técnica de Golgi y, en décadas posteriores, mediante los experimentos de trazado anterógrado a nivel poblacional. Estas discrepancias podrían deberse a una serie de limitaciones intrínsecas a este tipo de técnicas que conllevarían en último término a una importante subestimación del número real de neuronas multirramificadas. Es habitual, por ejemplo, que los distintos trazadores utilizados en un mismo experimento no sean captados y transportados por las neuronas con la misma eficacia, ya sea por características intrínsecas de los trazadores o por el daño tisular asociado a los depósitos (Schofield y cols. 2007). Puede suceder, también, que los patrones de ramificación de algunos axones sean muy complejos, y estén inervando regiones distintas con distinta especificidad, distinta densidad y con distintos patrones laminares. Además, pueden existir orientaciones selectivas en la distribución tangencial de los axones difíciles de detectar mediante depósitos corticales de trazadores. Por último, los sistemas de microscopía de fluorescencia utilizados podrían no tener la suficiente sensibilidad para

detectar la presencia de ambos trazadores, sobre todo si alguno de ellos se encuentra en muy poca cantidad. Una última limitación de esta técnica estaría en el hecho de no poder explorar más de 2 (o a lo sumo 3) dominios de inervación mediante la combinación de distintos trazadores.

Por otra parte, desde finales de los años 70 ya habían comenzaron a utilizarse algunos trazadores anterógrados, como la biocitina, para marcar neuronas aisladas en diversos estudios electrofisiológicos (Horikawa y Armstrong, 1988; Jankowska y cols., 1976; Stewart, 1978). Aunque la técnica de inyección intracelular utilizada permitía teñir tanto las dendritas como el axón de las neuronas y correlacionar los datos morfológicos con registros electrofisiológicos, resultaba muy poco eficiente “in vivo”, y solo permitía trazar adecuadamente neuronas de axón corto. Mas adelante se intentó mejorar la efectividad y calidad del trazado de neuronas aisladas “in vivo” mediante la técnica de inyección yuxtacelular (Pinault, 1996). Esta técnica consistía en iontoforetizar biotina o dextranos en la proximidad de la membrana de una neurona registrada extracelularmente utilizando corrientes de muy baja intensidad ($<10\text{nA}$). La menor agresividad del método favorecía la supervivencia de la neurona y permitía un mayor tiempo de transporte del trazador. Gracias a esta técnica se han podido trazar neuronas de proyección en diversas estructuras como la sustancia negra (Prensa y Parent, 2001; cebrian y cols., 2005), la corteza cerebral (Veinante y Deschenes, 2003; Parent y Parent, 2006) o el tálamo (Nosedá y cols., 2011) de la rata y del ratón. En el tálamo, se ha podido constatar que las NTPs multirramificadas parecen ser abundantes en algunos de los núcleos examinados. Es el caso de los núcleos intralaminares, cuyas neuronas proyectan simultáneamente el estriado y a la corteza cerebral (Deschenes y cols., 1995; 1996) o el Po (Veinante y Deschenes, 2003; Nosedá y cols., 2009; 2011), cuyas neuronas muestran patrones de proyección heterogéneos, pudiendo inervar también la corteza y el estriado. Sin embargo, la inyección yuxtacelular es una técnica muy laboriosa y de eficacia impredecible (Monconduit y Villanueva, 2005) con la que, hasta la fecha, sólo se han podido reconstruir con ella unas pocas neuronas talamocorticales. Además, la capacidad de marcar completamente un axón mediante la iontoforesis del trazador a muy bajas intensidades de corriente disminuye al aumentar la longitud y complejidad de éste, por lo que algunas (si no todas) las reconstrucciones axonales realizadas mediante esta técnica son, probablemente, incompletas (Veinante y Deschenes, 2003; Matsuda y cols., 2008).

La dificultad para lograr el trazado completo de axones complejos se ha superado recientemente gracias al desarrollo de técnicas muy sensibles de trazado, basadas en la transfección mediada por vectores virales de secuencias génicas codificantes para proteínas fluorescentes. A nivel poblacional, los vectores adenoasociados han sido especialmente útiles en el estudio de diversas vías corticocorticales, nigroestriatales y talamocorticales (McFarland y cols., 2009; Mao y cols., 2011; Harris y cols., 2012; Hunnicutt y cols., 2014; Oh y cols., 2014). Para el trazado de neuronas únicas, recientemente se ha diseñado un vector viral incompetente para la replicación y basado en el alfavirus RNA SINDBIS que expresa, bajo el potente promotor del virus, la proteína fluorescente verde GFP unida a una señal de palmitoilación (GAP-43) que la direcciona a la membrana (Furuta y cols., 2001). Utilizando una dilución adecuada de este potente vector, se han conseguido marcar en su totalidad neuronas aisladas de una forma consistente, sin importar la complejidad y extensión de sus axones (Matsuda y cols., 2009). Mediante esta técnica se ha podido visualizar la morfología de algunas neuronas de proyección en varios núcleos del tálamo de la rata, tales como el ventral anterior y el ventral lateral (Kuramoto y cols., 2009), el posterior (Ohno y cols., 2012), el ventromedial (Kuramoto y cols., 2015) y el lateral posterior (Nakamura y cols., 2015).

Teniendo en consideración los estudios de trazado más recientes, incluidos los datos preliminares de esta Tesis, nuestro grupo ha propuesto una nueva clasificación de las NTPs (REF). Esta clasificación está basada en las diferentes arquitecturas conectivas de sus axones que, en último término, son las que van a determinar su función. Así, hemos propuesto 4 morfotipos básicos:

- Las neuronas **talamocorticales específicas**, tal y como han descrito numerosos autores, inervan una única área cortical o, a lo sumo, 2 áreas adyacentes sin dejar colaterales en ninguna estructura subcortical (a excepción del NRpT). En la corteza cerebral arborizan densa y focalmente en las capas 4 y 3 y, de forma menos densa y más dispersa, en el límite entre las capas 5b y 6a. Este morfotipo neuronal predomina en los núcleos primarios de relevo sensitivos y motores, como el VP, el Geniculado Lateral Dorsal o el VL. En cuanto a su función, sus arquitecturas axonales les permiten transmitir a la corteza cerebral la información de origen subcortical procedente de los

receptores periféricos (o de los bucles multisinápticos cerebelosos) de forma muy precisa y topográfica. Por otro lado, la convergencia de sus terminales en las neuronas de la capa 4 convierte a estos axones en potentes conductores de la actividad cortical. (Bruno y Sackmann, 2006; Petreanu y cols., 2009; Sherman, 2012).

- Las neuronas **talamo-subcorticales** se caracterizan por inervar profusamente el estriado y, en menor grado, otras estructuras subcorticales como el núcleo entopeduncular o la amígdala. La inervación cortical, cuando se da, es poco profusa y bastante dispersa dirigiéndose, fundamentalmente, a las capas infragranulares de áreas adyacentes. Estas neuronas son características de los núcleos intralaminares y de los núcleos de la línea media, observándose algunas diferencias en cuanto a los patrones de inervación: las neuronas de los núcleos intralaminares anteriores (CeM, Pc y CL) tienden a arborizar extensamente en el estriado, pudiendo ejercer una modulación global sobre los circuitos multisinápticos de los ganglios basales. Por el contrario, las neuronas de los núcleos intralaminares posteriores (Cm-Pf) inervan también el estriado, pero formando diversos focos de ramas terminales. Se cree que estas neuronas pueden estar implicadas en procesos de aprendizaje y comportamiento mediados por los ganglios basales.

- Las neuronas **talamocorticales inespecíficas**, son aquellas que inervan regiones extensas de la corteza cerebral arborizando, generalmente, en la mitad externa de la capa 1 (capa 1a). En ocasiones, también arborizan en el estriado. Al inervar de forma preferente la capa 1 cortical, estas neuronas contactan con las dendritas apicales de las neuronas piramidales de las capas 2-3 y de las neuronas de la capa 5 que proyectan subcorticalmente. Ocupan, por tanto, una posición privilegiada para regular la comunicación corticocortical y cortico-subcortical de grandes territorios de la corteza cerebral. De acuerdo a los últimos trabajos Este tipo de neuronas predominan en núcleos como el VM, VA o LPM, donde estarían implicadas en la activación cortical ante estímulos dolorosos o auditivos de alta intensidad, o bien vehicularían la información de salida desde los ganglios basales.

- Por último, las neuronas **talamocorticales multiespecíficas** serían aquellas que inervan focalmente varias áreas corticales (adyacentes o no) y, en ocasiones, también el estriado. El patrón laminar de arborización cortical de una misma neurona puede variar en las distintas áreas inervadas. Estas arquitecturas axónicas son de especial interés ya

podrían facilitar la sincronización de las oscilaciones del potencial de membrana y regular los flujos de información en sus dianas postsinápticas. Además, el hecho de que un mismo axón pueda inervar láminas distintas de diferentes áreas podría hacer que un mismo tren de señales se computase en paralelo, pero de forma distinta, en diferentes áreas corticales.

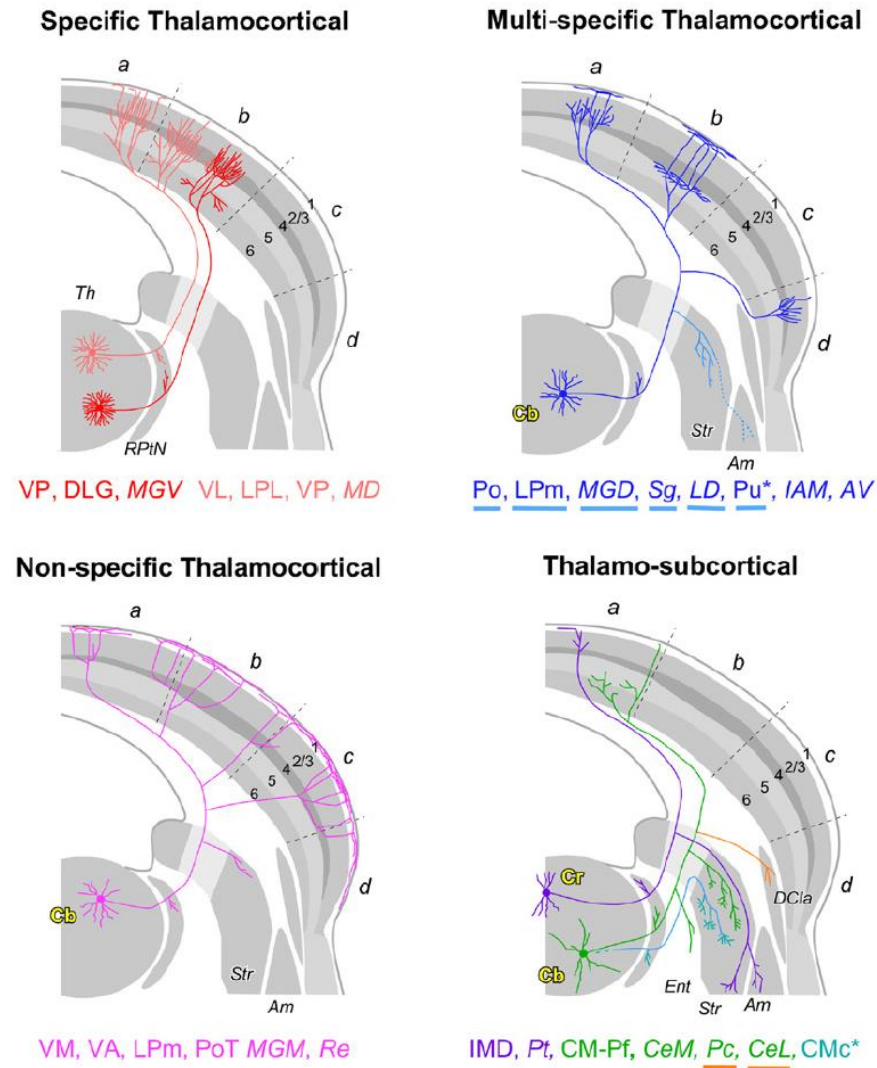


FIGURA 6: Clasificación de las neuronas talámicas de proyección propuesta por Clascá y cols. (2016). Ver texto

Los últimos estudios publicados de trazado poblacional y de neuronas aisladas (REFS) parecen indicar que las neuronas multiespecíficas son, probablemente, las más

abundantes en el tálamo de los roedores, especialmente en núcleos como el AV, LPM, MGD, LD o el Po.

De entre los núcleos donde las neuronas multiespecíficas parecen ser prevalentes, el núcleo posterior ha sido el más estudiado en las últimas décadas, tanto desde un punto de vista estructural como funcional. El interés por este núcleo se debe a su implicación en el procesamiento de aspectos dinámicos de la información somestésica, bien mediante el relevo de información subcortical, o bien mediante el relevo de información directriz de origen cortical. Su implicación en el procesamiento de información sensorimotora compleja, sus aferencias directrices corticales y las complejas arquitecturas axónicas de sus neuronas sitúan a este núcleo en una posición privilegiada como modelo de estudio para explorar las funciones talámicas más allá del mero relevo sensorial. Sin embargo, la complejidad y diversidad de sus patrones conectivos ha dificultado hasta ahora un entendimiento claro de la organización de sus relaciones sinápticas con otras estructuras cerebrales.

3. EL NÚCLEO POSTEROMEDIAL DEL TÁLAMO

3.1. Definición anatómica

El término “complejo posterior del tálamo” fué introducido por primera vez en el gato por Rose y Woolsey (1958) para referirse a un mal definido grupo de células que se encontraban en regiones centrales y caudales del tálamo, y que estaban relacionadas, principalmente, con los sistemas somestésico y auditivo (Jones). Dentro del “complejo posterior” podían definirse 2 núcleos principales:

- El núcleo limitans/suprageniculado: ubicado lateralmente al pretecho y a la lámina medular externa. Se continúa hasta unirse a la porción magnocelular del núcleo geniculado medial.
- El núcleo posterior, formado por 3 subdivisiones: medial (Pom), lateral (Pol) e intermedio (Poi). Pol y Poi guardarían relación con el sistema auditivo, mientras que el Pom estaría relacionado con el sistema somatosensorial.

Las 3 subdivisiones del núcleo posterior sólo aparecen claramente diferenciadas en los carnívoros. En primates, el núcleo limitans/suprageniculado aparece claramente definido, mientras que partes del Pol y del Poi han pasado a estar integradas en el núcleo dorsal del complejo geniculado medial. Parte del Pom (su porción anterior) comparte claras homologías con el núcleo pulvinar anterior, mientras que su porción posterior equivale al núcleo posterior y los campos supralemniscales.

En roedores, dentro de los cuales la rata ha sido la especie más estudiada, no se aprecia el núcleo limitante-suprageniculado. Regiones comparables a las divisiones Pol y Poi del gato aparecen como expansiones del núcleo lateral posterior en el lóbulo dorsal del complejo geniculado medial. Solo la subdivisión medial del núcleo posterior aparece claramente diferenciada, siendo generalmente conocida como núcleo posterior medial (Pom). En este núcleo se han diferenciado dos partes: la porción anterior (Pom propiamente dicho o, simplemente Po – Paxinos-), más claramente definida, se extiende dorsalmente al núcleo ventral posterior, a lo largo del borde lateral de los núcleos central lateral y parafascicular, y ventral al complejo lateral posterior. La porción posterior, menos definida, se extiende a lo largo del borde medial del complejo geniculado medial, quedando limitada medialmente por el pretecho. Esta región ha sido

conocida por diversos nombres, como porción caudal del núcleo posterior (Poc) (Diamond) o núcleo triangular (Paxinos)

Debido a las similitudes en cuanto al tamaño de sus somas y sus proyecciones a capa 1, se ha propuesto que el Pom de los roedores podría corresponderse con la matriz de neuronas que rodea a los “rods” del complejo ventral posterior del tálamo de los primates (Diamond)

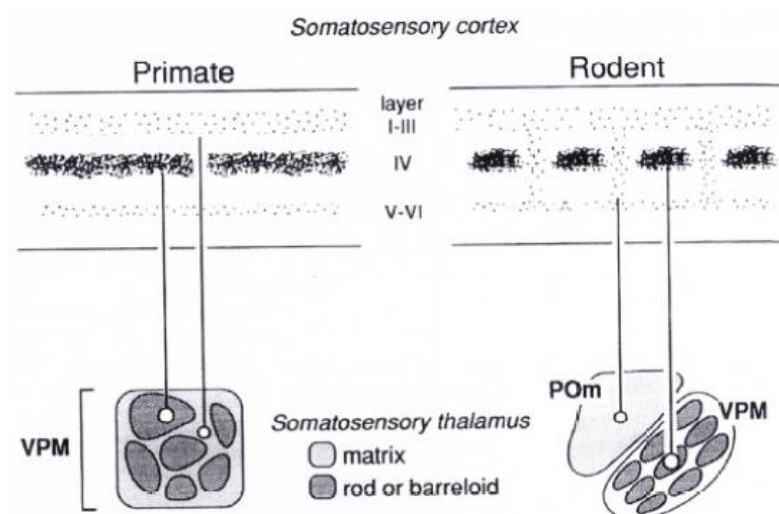


FIGURA 7: Equivalencias establecidas entre el tálamo somatosensorial de los primates y los roedores. Tomado de Diamond.

3.1. Estudios mediante técnicas de marcado poblacional de las proyecciones del Po

Los primeros estudios que trataron de describir las proyecciones talamocorticales del “complejo posterior” fueron realizados en el gato. Mediante estudios de degeneración retrógrada, Rose y Woolsey (1958) observaron que los núcleos limitante-suprageniculado y Pom se atrofiaban si se lesionaban regiones amplias de corteza que abarcaban las áreas auditivas, la corteza somatosensorial secundaria y la corteza insular. Si la lesión quedaba restringida sólo a alguna de las áreas, no se producía atrofia en estos núcleos talámicos. Los autores concluyeron, por tanto, que los núcleos limitante – suprageniculado y Pom proyectaban a regiones extensas de la corteza cerebral.

Estudios posteriores basados en experimentos de degeneración axonal anterógrada por lesión del complejo posterior del tálamo (Heath, 1970; Hand y Morrison, 1970; Heath y

Jones, 1971), y de trazado con HRP (Jones y Leavitt, 1973) confirmaron las proyecciones extensas a áreas insulares y auditivas propuestas por Rose y Woolsey. Pese a que no se habían observado neuronas marcadas en el complejo posterior tras la inyección de trazadores retrógrados en S1 y S2, Rowe y Sessle (1968) y Curry (1972) observaron que estas neuronas sí podían activarse antidrómicamente estimulando eléctricamente cualesquiera de estas áreas somestésicas. Posteriormente, con métodos de marcado más sensibles también se describieron conexiones recíprocas entre el Po y S3 (5a) (Tanji et al., 1977; Hendry et al., 1979; Avendaño et al., 1985)

En la rata, en un estudio de 1974 sobre las proyecciones de los núcleos de la línea media en diferentes especies, Jones y Leavitt observaron que tras realizar inyecciones de HRP en cortezas auditivas o visuales de la rata, podían marcarse algunas neuronas en regiones muy caudales del núcleo posterior. Posteriormente, Donoghue (1979) realizó inyecciones de HRP en diferentes representaciones de la corteza somestésica primaria (S1HL, S1Face) y motora primaria (M1Face) de la rata, obteniendo focos de neuronas marcadas retrógradamente en el Po en todos los casos. Además, las neuronas marcadas desde áreas diferentes estaban en regiones distintas del Pom. Realizando inyecciones de aminoácidos tritiados en el Po de la rata, Herkenham (1980) observó extensas proyecciones en cortezas somatosensoriales y motoras. Estas proyecciones presentaban un patrón laminar distinto en cada área: en las áreas motoras agranulares las terminaciones se localizaban en las capas 1 y 3, en S1 granular se localizaban en las capas 1, 5 y 6. Por último, en las regiones disgranulares de S1 y en las cortezas parietales homotópicas, las proyecciones terminaban las capas 4 y 1. Trabajos posteriores basados en inyecciones corticales superficiales de HRP (Rieck and Carey, 1982) y de D-3H-aspartate (Ottersen et al., 1983) confirmaron las proyecciones del Po a las capas superficiales de las cortezas motora y somestésica en la rata.

Spreafico (1987) estudió las proyecciones talamocorticales a S1 y a S2 mediante experimentos de trazado retrógrado simple (HRP) o doble (fast blue y diamidino yellow) en la rata. Tras inyectar los trazadores en la representación cortical de la extremidad anterior en S1 observó neuronas retrógradamente marcadas en las regiones anteriores y caudales del Po, mientras que las inyecciones realizadas en las representaciones de las extremidades anteriores y posteriores en S2 producían marcaje en las regiones caudales de Po. En los experimentos de doble trazado observaron una

pequeña zona de solapamiento entre las regiones del Po proyectantes a S1 y S2. En esta zona, solo unas pocas neuronas (no cuantificadas), menos aún que las obtenidas en el mismo experimento realizado en el gato (Spreafico et al., 1981), aparecían doblemente marcadas. Estos resultados parecían indicar que las neuronas proyectantes a S1 y S2 formaban dos poblaciones prácticamente independientes.

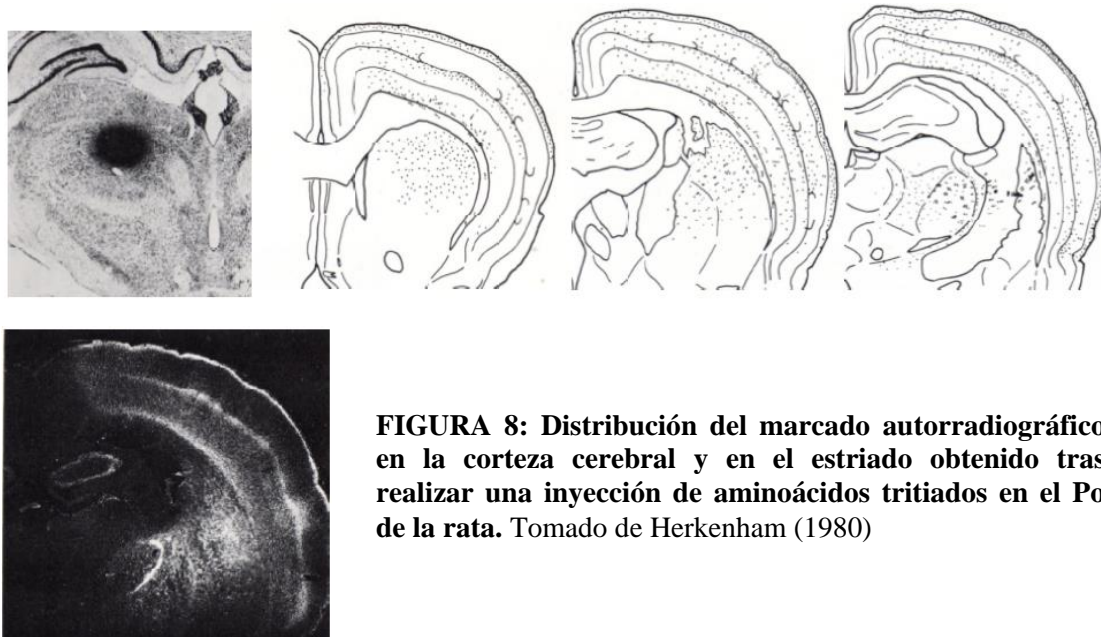


FIGURA 8: Distribución del marcado autorradiográfico en la corteza cerebral y en el estriado obtenido tras realizar una inyección de aminoácidos tritiados en el Po de la rata. Tomado de Herkenham (1980)

Nothias (1988) inyectó HRP en diferentes regiones (no identificadas a priori) de la corteza cerebral de la rata y observó que solo desde aquellas inyecciones localizadas en S1 (inyecciones desde las que se marcaba el complejo ventrobasal) se obtenían neuronas marcadas retrógradamente en el Po. A partir de estas inyecciones realizó un primer estudio sobre la organización de las proyecciones del Po, describiendo como sus neuronas formaban bandas en el eje rostrocaudal y se organizaban somatotópicamente de manera que: las que proyectaban a HL se localizaban en la región dorsal del núcleo, las que proyectaban a SIFace en la región ventral, y las que lo hacían a FL en una localización intermedia.

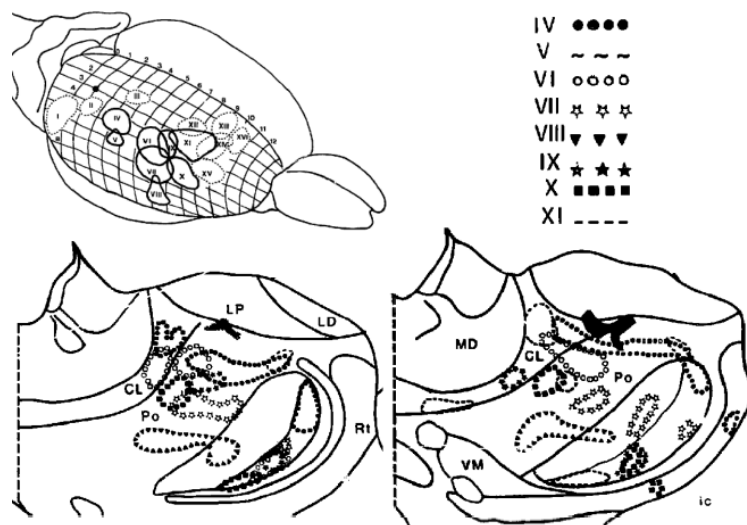


FIGURA 9: Localización del marcado neuronal obtenido en el tálamo tras realizar varios depósitos de HRP en diferentes regiones de la corteza cerebral de la rata. Tomado de Nothias (1988)

Posteriormente, Fabri y Burton (1991) profundizaron en el estudio de la topografía de las conexiones entre S1 y el Po utilizando la combinación de dos o tres trazadores retrógrados aplicados en distintas localizaciones de la corteza somatosensorial primaria de la rata. Confirmando los resultados obtenidos por Nothias (1988), observaron también que la porción anterior del Po estaba topográficamente organizada como una representación corporal que sería una imagen especular de la descrita para el VB (REF). Esta organización topográfica desaparecía en la región mas caudal del Po.

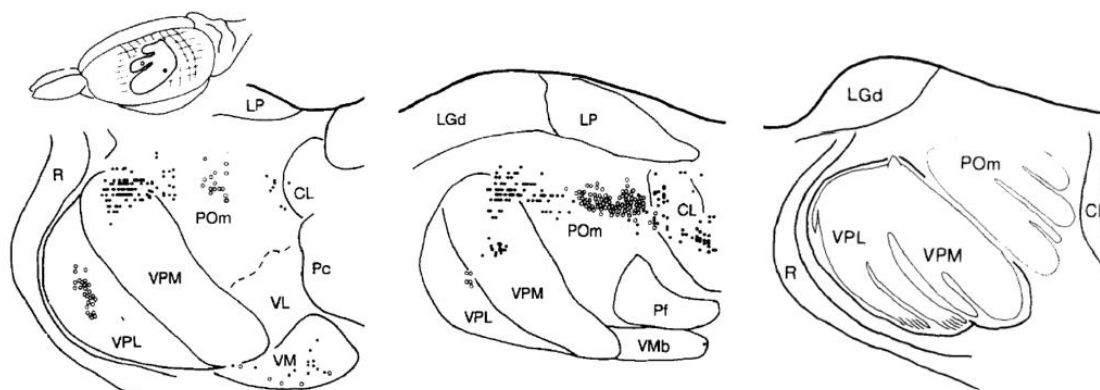


FIGURA 10: Distribución en el tálamo de las neuronas marcadas desde dos depósitos de trazadores retrógrados realizados en dos representaciones distintas (espinal y trigeminal) de la corteza somatosensorial de la rata. A la derecha se indica el mapa somatotópico propuesto. Tomado de Fabri y Burton (1991)

Koralek (1988) investigó por primera vez las diferencias en los patrones laminares de inervación cortical en S1 del Po frente a los del VP. Para ello inyectó aglutinina de germen de trigo conjugada con peroxidasa (WGA-HRP) en ambos núcleos y examinó la distribución de los terminales axónicos en cortes tangenciales de S1, observando que a nivel de la capa 4 tenían un patrón complementario: los axones del VP arborizaban en los barriles de forma densa, mientras que los del Po lo hacían en las zonas disgranulares de S1 y en los septa. También observó proyecciones del Po en S2. Trabajos posteriores (Chmielowska, 1989) confirmaron el patrón complementario descrito por Koralek.

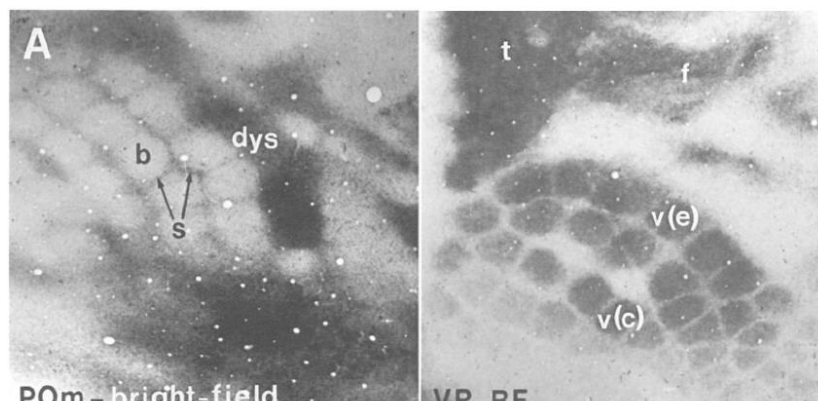


FIGURA 11: Patrones tangenciales de arborización de los axones del Po (izquierda) y VPM (derecha) en la capa 4 de la corteza de barriles . Tomado de Koralek (1988)

Unos años después, Lu y Lin (1993) estudiaron con más detalle las proyecciones del Po en la corteza de barriles. Para ello inyectaron los trazadores PHA-L o HRP en los núcleos VPM y Pom del tálamo de la rata y estudiaron sus proyecciones a nivel de microscopía óptica y electrónica a partir de cortes coronales, lo cual les permitió analizar tanto la distribución tangencial como la laminar. Observaron que toda la corteza de barriles recibía proyecciones tanto desde VPM como desde Pom, pero con distintos patrones laminares y con distintas densidades: VPM proyecta a las capas 4 y 6 de las columnas de barriles, siendo la proyección a los barriles de capa 4 de gran densidad; por el contrario, el Pom proyecta con menor densidad a las capas 5 y 1 de las columnas de barriles y a las capas 4 y 1 de los septa. Por otra parte, la distancia interbotón de los axones del Pom en la capa 4 de los septa era más del doble de la medida para los axones del VPM en los barriles. A nivel ultraestructural, sin embargo, no observaron diferencias entre los contactos sinápticos establecidos por los axones del

Po frente a los del VPM. Cabe destacar, no obstante que no se tuvieron en cuenta parámetros relativos a la eficacia sinápticas como por ejemplo el tamaño de las varicosidades.

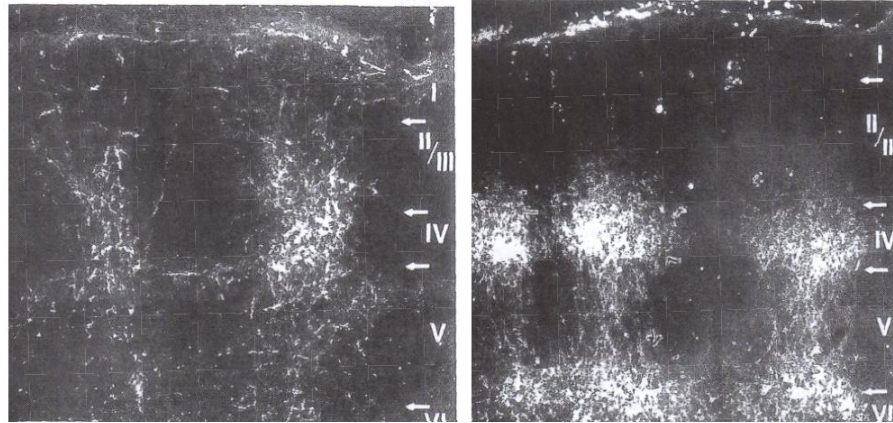


FIGURA 12: Patrones laminares de arborización de los axones del Po y del VPM en la capa 4 de la corteza de barriles de la rata. Tomado de Lu y Lin (1993)

En los últimos años se ha podido estudiar cualitativa y cuantitativamente la distribución en la corteza cerebral de la rata, no ya de los axones, sino de los botones sinápticos pertenecientes a las proyecciones talamocorticales del VPM y Po. Para ello, se han utilizado vectores virales adenoasociados diseñados para expresar sinaptofisina unida a la proteína fluorescente GFP, que marcaría por tanto las vesículas sinápticas (Wimmer y cols., 2010; Meyer y cols., 2010). Con este método comprobaron que la capa más densamente inervada por los axones del Po en S1BF era la 5a, con un pico máximo de densidad similar al establecido por los terminales de los axones procedentes del VPM en los barriles de la capa 4.

Recientemente, el grupo de Murray Sherman también ha estudiado, junto a otros parámetros funcionales, el tamaño de los botones sinápticos formados por los axones del Po (Viaene y cols., 2011) en distintas áreas y capas corticales. Para ello realizaron grandes inyecciones de dextrano en el núcleo y midieron el área de los botones en todas las capas (a excepción de la 1) de las áreas S1BF y S2. Los botones en S1BF resultaron ser de tamaño pequeño en todas las capas estudiadas (2/3 – 6). Por el contrario, en la capa 4 de S2 se encontraron botones grandes, similares a los formados por los axones del VPM en la capa 4 de S1BF. Sin embargo, no pudieron determinar si era un mismo axón o axones distintos los que producían patrones de arborización distintos en ambas

áreas corticales. Tampoco obtuvieron datos referentes a la posible inervación de otras áreas corticales. En cuanto a las proyecciones subcorticales, mediante un estudio realizado con trazadores retrógrados y anterógrados (Smith y cols., 2012) se pudo comprobar que la principal proyección talámica a la región dorsolateral del estriado (SDL) provenía del Po, sobre todo de la zona limitante con el VPM. Se observó también que estas proyecciones terminaban, principalmente, a lo largo del borde entre el SDL y la cápsula interna, formando pequeñas varicosidades de paso. Se encontraron, además, pequeños focos axonales en el neuropilo del SDL. En un estudio posterior (Alloway y cols., 2014), este mismo grupo demostró, con inyecciones de BDA, que la mayoría de las proyecciones talamoestriatales procedentes de la región de vibrisas del Po se dirigían a regiones del SDL caudales a Bregma. Estas proyecciones también se dirigían a la corteza de barriles de S1 y a la representación de vibrisas de la corteza motora. Aunque estos resultados sugerían una ordenación topográfica de las proyecciones talamoestriatales (y talamocorticales) del Po, no se investigaron los patrones de proyección desde otras regiones del núcleo. Tampoco era posible saber si eran las mismas neuronas las que inervaban las diferentes dianas sinápticas o bien se trataba de poblaciones neuronales distintas.

3.2. Estudios de trazado de neuronas individuales

Los primeros estudios de marcado anterógrado completo y reconstrucción de axones individuales del Po fueron realizadas en el laboratorio de Martin Deschenes a partir de inyecciones yuxtacelulares de BDA. Estas reconstrucciones fueron incluidas en una revisión sobre la organización de las proyecciones corticotalámicas publicada a finales de los años 90 (Deschenes y cols., 1998). En este trabajo se mostraron las arborizaciones axonales (algunas de ellas incompletas) de un total de 5 neuronas, todas ellas localizadas en regiones laterales del núcleo (próximas al VPM). Excepto una de ellas, que parecía arborizar sólo en S1, el resto lo hacían focalmente en 2 o 3 áreas corticales: uno de los focos siempre estaba en S1 y el resto en S2, corteza perirrinal y/o áreas motoras. Además de la corteza, 3 de estas neuronas también inervaban el estriado. En cuanto al patrón laminar, en dos de los casos, la arborización de S1 se distribuía en las capas 5a y 1, en otro caso era más profusa en las capas 4 y 3, aunque también arborizaban en 5a y 1; en las otras 2 neuronas la máxima densidad axonal parecía concentrarse en el límite entre las capas 4 y 5, habiendo también inervación en la capa 1. En S2, una de las neuronas arborizaba en la capa 4, mientras que otra de las neuronas

lo hacía exclusivamente en la 1. Las dos neuronas que arborizaban en la corteza perirrinal lo hacían en las capas 5a, 4 y 1. Por último, la neurona que inervaba las áreas frontales arborizaba profusamente en la capa 4 de Fr1 y, de forma menos profusa, en la capa 3 de Fr2. Aunque en el estudio no se daba ninguna explicación a la heterogeneidad de fenotipos obtenidos, las diferencias observadas en los patrones tangenciales y laminares de las 5 neuronas podría deberse a su localización en subdominios distintos del núcleo y/o a la existencia de diferentes patrones de inervación en diferentes subregiones (no delimitadas en las figuras) de una misma área cortical. A este respecto, es interesante destacar que en el único experimento donde se han reconstruídos 2 neuronas adyacentes, los patrones de arborización obtenidos son casi idénticos.

Gauriau y Bernard (2004) mostraron la reconstrucción de dos neuronas localizadas en la región más caudal del Po (PoT), que también habían sido marcadas mediante la inyección yuxtacelular de dextrano biotinilado. A diferencia de las neuronas publicadas por Deschenes, las dos neuronas aquí mostradas arborizaban en una única región cortical. Una de ellas inervaba las capas 4 y 6 de S2, mientras que la otra arborizaba, fundamentalmente, en la capa 5 de la corteza insular. Esta última neurona arborizaba, a su vez, en el estriado. De todas formas, la reconstrucción de estos árboles axónicos fue incompleta, al no haberse usado la totalidad de las secciones y al no haberse producido un buen relleno con el trazador (Figura 13B).

En dos trabajos centrados en el estudio de neuronas talámicas que vehiculan información nociceptiva desde la duramadre (Nosedá y cols., 2010; 2011) se mostraba la reconstrucción completa de un total de 5 neuronas del Po de la rata marcadas mediante la inyección yuxtacelular de dextrano- TMR. La calidad del marcado en estos experimentos parece mejor que la obtenida por Gauriau y Bernard, y la reconstrucción de las arborizaciones axonales se realizaron utilizando todas las secciones de tejido. Al igual que en los experimentos de Deschenes, se obtuvieron neuronas que arborizaban focalmente en varias regiones corticales (de 2 a 5). Cuatro de las 5 neuronas arborizaban en una o varias subregiones de S1 y, además, en otras áreas corticales visuales, auditivas o asociativas. La quinta neurona arborizaba casi exclusivamente en S2, aunque dejando una pequeña colateral en la corteza insular. Una sexta neurona, que no aparece ilustrada, arborizaría exclusivamente en áreas motoras. El patrón de arborización laminar no se aprecia claramente en las reconstrucciones al no indicarse en los dibujos los límites

entre capas (Figura 13C). No obstante, se incluye un análisis cualitativo donde se observan diferencias entre áreas distintas y entre neuronas distintas dentro de una misma área. En cualquier caso, la capa 4 parece ser, casi siempre, la más densamente inervada. Se ha descrito que alguna de estas neuronas inerva también el estriado, pero no se indica cual de ellas. Tampoco se relaciona la posición de los somas en el núcleo con los fenotipos axonales mostrados.

Un estudio mucho más detallado sobre la morfología de los axones talamocorticales del Po ha sido realizado recientemente por el grupo de Takeshi Kaneko, de la Universidad de Kyoto (Ohno y cols., 2011). En este trabajo se muestra la reconstrucción axonal completa de un total de 10 neuronas marcadas con el vector viral Sindbis-pal-GFP que, a diferencia de los dextranos inyectados yuxtacelularmente, aseguraba el relleno completo del axón. Además de las reconstrucciones axonales realizaron una estimación de la longitud axonal en las áreas principales y en las diferentes capas dentro de cada área, e intentaron sistematizar los diferentes fenotipos axonales obtenidos en función de la localización del soma en el núcleo y la expresión de calbindina. Observaron que las 10 neuronas reconstruidas arborizaban en alguna región de S1, y la mayoría de ellas lo hacían también en otras áreas corticales como M1, M2, S2, auditiva, insular y ectorrinal. Algunas de las neuronas arborizaban, a su vez, en el estriado. Según estos autores, las neuronas situadas en la parte anterior del núcleo, caracterizada por su débil expresión de calbindina, proyectarían a la corteza de forma menos dispersa que las situadas en la parte posterior, más rica en calbindina. También existirían diferencias en cuanto al patrón de proyección laminar en las distintas regiones del núcleo, ya que las neuronas situadas en la parte anterior proyectarían principalmente a la capa 5a, mientras que las situadas en la parte posterior lo harían a la capa 1. Por último, observaron que eran las neuronas situadas en la parte posterior del núcleo tenían una mayor tendencia a proyectar al estriado (Figura 13D)

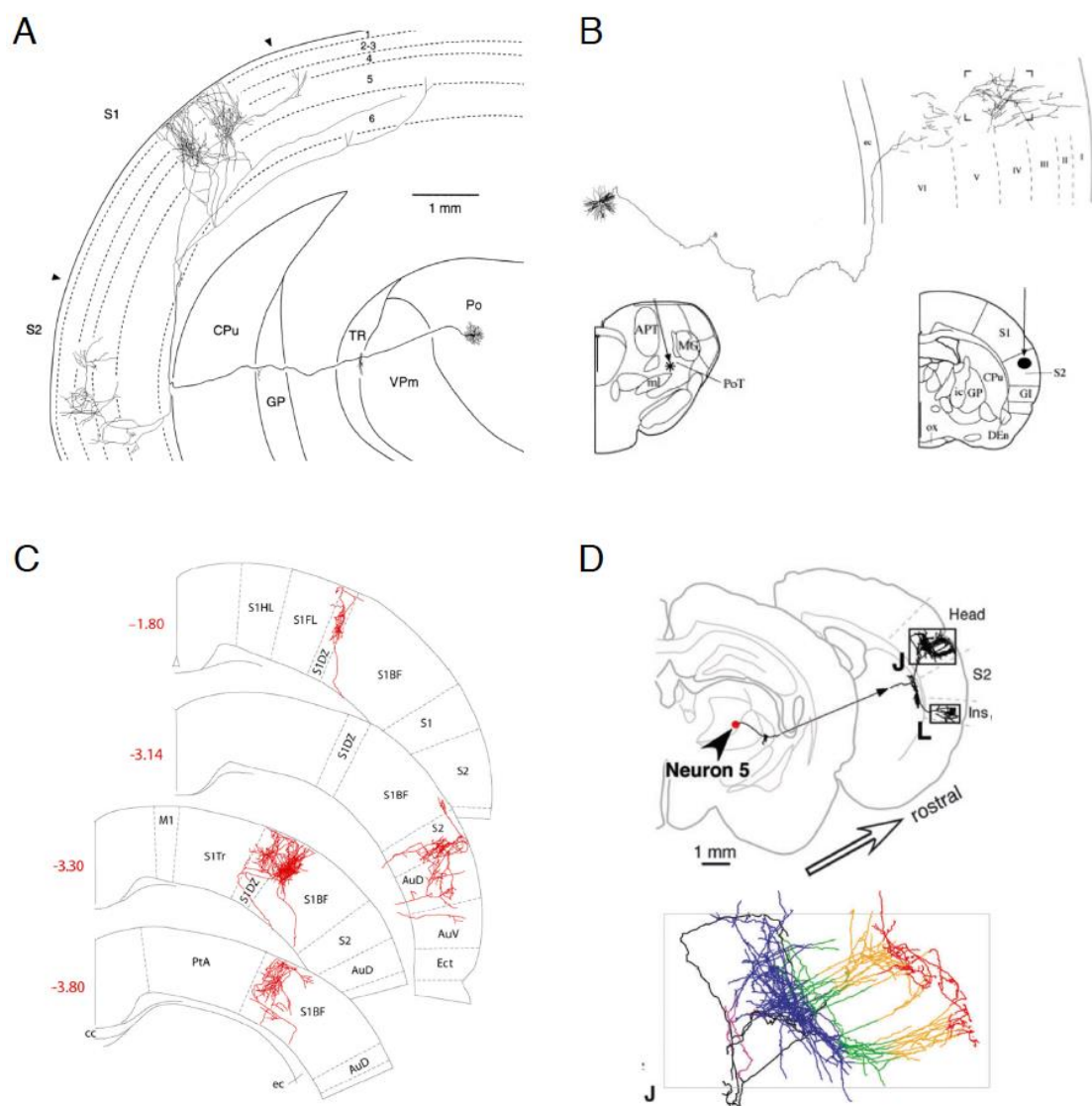


FIGURA 13: Morfología de algunas neuronas individuales marcadas en el Po de la rata en diversos estudios.

Neurona	Técnica	Localización	Áreas Corticales (Capas)	Inervación Subcortical	Referencia
1*	Poblacional pequeña	Lateral	S1 (5a, 1) Prh (5a, 4, 1) Mot ?	Cpu	Deschenes y cols., 1998
2*	Poblacional pequeña	Lateral	S1 (5a, 1) S2 (1) Prh (5a, 4, 1)	Cpu	Deschenes y cols., 1998
3	Yuxtacelular	Lateral	S1 (5a, 4, 2, 1)	Cpu	Deschenes y cols., 1998
4	Yuxtacelular	Lateral-Dorsal	S1 (4, 3, 5a, 1) Fr1 (4, 3, 5a, 1) Fr2 (3)	-	Deschenes y cols., 1998
5	Yuxtacelular	Lateral-Dorsal	S1 (5a, 4, 1) S2 (4)	GP (escasa)	Deschenes y cols., 1998
6*	Yuxtacelular	PoT	S2 (4, 6, 3)	-	Gauriau y Bernard, 2004
7*	Yuxtacelular	PoT	Ins (5, 6)	AStr	Gauriau y Bernard, 2004
8	Yuxtacelular	B-3.30 Centro - Límite Po/LP	V2L (1, 2, 3, 4, 5) V2ML (5, 4) PtA (2, 3, 4) S1BF (2, 3, 4, 5) RSA (2, 3)	-	Nosedá y cols., 2010
9	Yuxtacelular	B-3.80 Lateral-Dorsal	V1B (4, 3, 5, 1, 2) S1 (4, 5, 3, 1, 2) S1Tr (1, 2, 3, 4, 5) PtA (3, 4, 5, 1) RSA (1, 2, 3)	-	Nosedá y cols., 2010
10	Yuxtacelular	No indicada	S1BF (1, 4, 5, 6) S1DZ (1, 4, 5, 6) S2 (1, 3, 4, 5) AuD (4, 5)	-	Nosedá y cols., 2011
11	Yuxtacelular	No indicada	S1HL (4, 3, 2) S1FL (5, 4, 3, 2, 1) S1Tr (5, 4, 3, 2, 1) RSGb (1) AuD (5, 4)	-	Nosedá y cols., 2011
12	Yuxtacelular	No indicada	S2 (5, 4, 3, 1) Ins (no arboriza)	-	Nosedá y cols., 2011

TABLA 1: Resumen de la localización y la distribución axonal de todas las neuronas del Po que se han conseguido marcar de forma aislada hasta la fecha

Neurona	Técnica	Localización	Áreas Corticales (Capas)	Inervación Subcortical	Referencia
13	Sindbis	B-3.25 Dorsal	M1 (2, 3, 5, 1) S1HL (5a, 4, 3)	No	Ohno y cols., 2011
14	Sindbis	B-3.25 Ventral	S1DZ (5a, 1) S1Head (5a, 4) S2 (no arboriza) M1 (5a, 3, 1)	No	Ohno y cols., 2011
15	Sindbis	B-3.6 Medial-Dorsal	S1HL (5a, 4, 3, 1) S1FL (5a, 4, 3, 1) S1Head (no arboriza) M1 (2/3)	No	Ohno y cols., 2011
16	Sindbis	B-3.6 Dorsal	S1HL (5a, 1) Au (5a, 4, 2/3) M1 (5a, 1) M2 (no arboriza)	No	Ohno y cols., 2011
17	Sindbis	B-3.95 Lateral	S1BF (5a, 1) Ins (4, 3)	Cpu	Ohno y cols., 2011
18	Sindbis	B-3.95 Medial-Dorsal	S1HL (5a, 1) M2 (5a, 2/3, 1)	Cpu	Ohno y cols., 2011
19	Sindbis	B-4.3 Medial-Ventral	S1Head (5a, 1) Ins (5a, 4, 1)	Am?	Ohno y cols., 2011
20	Sindbis	B-4.3 Dorsal	S1DZ (5b, 1) S1Head (1) M1 (5a, 2/3, 1)	Cpu	Ohno y cols., 2011
21	Sindbis	B-4.65 Ventral	S1FL (5a, 4, 1) S1DZ (5a, 1) S1Head (1) S2 (5a, 4, 3, 1)	Cpu	Ohno y cols., 2011
22	Sindbis	B-4.65 Dorsal	S1Tr (1) S1Head (1) S2 (1) Ect (1) Ins(1)	No	Ohno y cols., 2011

TABLA 1 (Continuación): Resumen de la localización y la distribución axonal de todas las neuronas del Po que se han conseguido marcar de forma aislada hasta la fecha

3.3. Estudios funcionales

Desde los primeros estudios anatómicos realizados en el gato por Rose y Woolsey (1958), al Po siempre se le han atribuido funciones relacionadas con el procesamiento de información somestésica. A día de hoy, tanto el origen como la modalidad de la información que transmite es controvertida (Ahissar y Oram, 2015). Concretamente, se ha estudiado la implicación del núcleo en a) la transmisión de información nociceptiva b) el tacto háptico y c) el relevo de información entre la corteza somatosensorial primaria y la secundaria. Salvo algunas excepciones, casi todos estos estudios se han centrado exclusivamente en su relación con la corteza somatosensorial primaria y, especialmente, con la corteza de barriles

3.3.1. Primeros estudios en el gato e implicación en el dolor

Poggio y Mountcastle (1960) fueron los primeros en comparar las respuestas del complejo posterior (núcleos núcleos suprageniculado, Pom, Pol, Poi y núcleo geniculado medial magnocelular) y del VP mediante registros de neuronas individuales en gatos anestesiados. Observaron que la mayoría de las neuronas del VP tenían campos receptivos pequeños y contralaterales, y respondían a un único tipo de estímulo. Por el contrario, el 60% de las neuronas registradas en el complejo posterior respondían sólo a estímulos nocivos. De las neuronas restantes, gran parte de ellas se activaban por estimulación mecánica ligera de la piel y pelo, pero presentaban campos receptivos muy grandes que podían ser ipsilaterales, contralaterales o incluso ambos, no observando ninguna somatotopía. Muchas de las neuronas eran también polimodales, respondiendo a estímulos nociceptivos y suaves aplicados en diferentes regiones del cuerpo y, a menudo, respondiendo a estímulos auditivos y vibratorios. En cuanto a la localización en el núcleo de estas neuronas, se observaron diferencias: las neuronas que respondían a estímulos somestésicos se localizaban en regiones anteriores del núcleo mientras que las polimodales eran ubícuas. En base a estos resultados, Poggio y Mountcastle postularon que el complejo posterior estaba relacionado principalmente con el sistema espinotalámico y la sensibilidad dolorosa. El núcleo VP, por el contrario, estaría relacionado con el tacto discriminativo. Estudios posteriores realizados en primates y en gatos confirmaron la predominancia de aferentes espinotalámicos en el complejo

posterior y su implicación en la nocicepción (Casey, 1966; Perl y Whitlock, 1961; Whitlock y Perl, 1961; Calma, 1965; Rowe y Sessle, 1968; Berkley, 1973)

Posteriormente, Curry (1972a,b; Curry y Gordon, 1972) realizó un estudio más detallado de la región caudal del Pom (incluyendo la porción magnocelular del núcleo geniculado medial) en gatos. Región que algunos estudios anatómicos ya habían relacionado con las proyecciones espinales y trigeminales.

Así, mediante estimulaciones eléctricas selectivas de la médula espinal, se observó que la mayor aferencia del Po no provendría de la vía espinotalámica, sino de los núcleos de la columna dorsal contralaterales y del tracto espinocervical. Todas las respuestas fueron de menor amplitud que las obtenidas en el núcleo ventral posterior. Al contrario que Poggio y Mountcastle, Curry (1972b) observó que las neuronas registradas en el Pom respondían a estímulos somestésicos inócuos, especialmente al movimiento del pelo. Los campos receptivos eran grandes y, en ocasiones, bilaterales. Sólo unas pocas neuronas respondían a estímulos nocivos o auditivos, mientras que en un 20% parecía haber una convergencia de información somestésica y auditiva. Las discrepancias entre los resultados obtenidos se debería a diferencias en la localización de los registros, reflejándose una heterogeneidad dentro del Pom.

En los últimos años, Gauriau y Bernard (2004) estudiaron en ratas anestesiadas la respuesta de las neuronas del PoT a estímulos táctiles o nocivos aplicados en distintas regiones del cuerpo. El 41% de las neuronas respondieron a la estimulación cutánea: el 45% sólo ante estímulos nociceptivos aplicados en campos receptivos grandes, el 19% ante estímulos nociceptivos e inócuos y el 36% ante estímulos táctiles inócuos aplicados de forma repetida sobre campos receptivos pequeños. Los autores encontraron que las neuronas nociceptivas específicas parecían inervar únicamente S2, mientras que las nociceptivas no específicas y las táctiles lo hacían predominantemente en la corteza insular y amígdala. En consonancia con estos resultados y con otros estudios previos, Zhang y cols. (2005) demostraron mediante técnicas de activación microantidrómica que el PoT era el núcleo que recibía una mayor proyección del tracto espinotalámico en la rata. También demostraron que la inmensa mayoría de estos axones vehiculaban información nociceptiva mecánica y térmica.

Dos estudios recientes realizados en rata también han demostrado la activación de neuronas del Po tras la estimulación dolorosa de la almohadilla de las vibrisas (Frangeul y cols., 2014) y de la duramadre (Nosedá y cols., 2011), aunque en ambos casos la localización de las neuronas resultó ambigua.

3.3.2. Estudios en la rata e implicación en el tacto háptico

El papel de las proyecciones del Pom a la corteza somatosensorial primaria de la rata se ha investigado con detalle desde los años 90, principalmente como parte de una vía de procesamiento de información somestésica de las vibrisas distinta (paralemniscal) a la bien estudiada vía lemniscal, que transcurre a través del VPM.

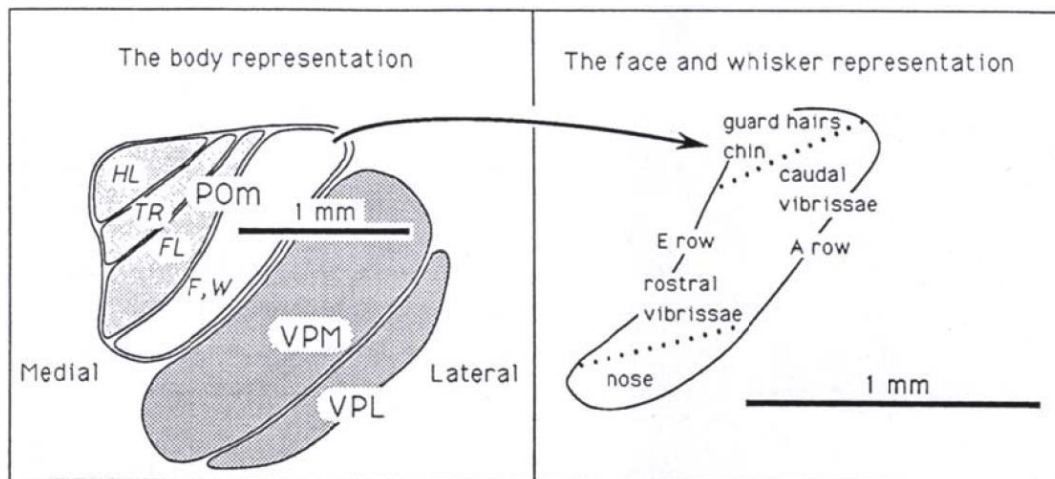


FIGURA 14: Mapa de la organización somatotópica del Po de la rata en base a los registros obtenidos después de estimular distintas regiones del cuerpo de la rata.
Tomado de Diamond (1992)

Diamond (1992a), estudió las respuestas sensoriales del Pom y el VPM en ratas anestesiadas con uretano tras estimular mecánicamente diversas regiones del cuerpo, incluidas las vibrisas. Confirmó que en las regiones anteriores del Po, tal y como se podía inferir de estudios anatómicos previos sobre las conexiones con S1, había una representación somatotópica contralateral del cuerpo (FIG...). Tras estimular las vibrisas, los campos receptivos en el Po resultaron tener un tamaño similar a los del VPM (5.1 vibrisas en el Po frente a 4.4 en el VPM). Sin embargo, había algunas diferencias en las respuestas evocadas por ambos núcleos: en primer lugar, mientras que las neuronas del VPM respondían predominantemente a la estimulación de una única vibrisa (el centro del campo receptivo), las del Po respondían por igual a la estimulación de varias de ellas. En segundo lugar, observaron que la latencia de la

respuesta en el Po era 3 veces mayor que en el VPM, lo que abría la posibilidad de que fuera la propia corteza la responsable de las respuestas del Po. Para comprobar esto, se midió la respuesta de las neuronas del VPM y Po al movimiento de las vibrisas antes, durante y después de suprimir la actividad de la corteza de barriles en ratas anestesiadas (Diamond y cols., 1992b). Cuando inactivaron la corteza de barriles, observaron una respuesta clara en las neuronas del VPM ante el movimiento de las vibrisas. Por el contrario, las neuronas del Po dejaban de responder, disminuyendo también su actividad espontánea.

Debido a la alta latencia de sus respuestas, su poca resolución espacial y su dependencia de la corteza, se planteó si la llamada vía “paralemniscal” que conectaba las vibrisas de los roedores con la corteza de barriles a través del Po estaba realmente implicada en el procesamiento de la información táctil. En cualquier caso, para estudiar las propiedades fisiológicas de sus neuronas era necesario utilizar otros protocolos de estimulación sensorial. Para estudiar las diferencias de procesamiento entre ambas vías se realizaron registros unitarios y multiunitarios en diferentes estaciones mientras se inducía pasivamente el movimiento de las vibrisas con un rango de frecuencias de 2-8Hz, que simulaban las condiciones de exploración natural. Se observó que, a diferencia de lo que ocurría en el tronco del encéfalo, el tálamo no se comportaba como un mero relevo de información, ya que transformaba la señal que recibía: tanto en el VPM como en el Po había una disminución en la magnitud de la respuesta a medida que se incrementaba la frecuencia del estímulo. Sin embargo, en el VPM la latencia de la respuesta no cambiaba, mientras que en el Po la latencia de la respuesta aumentaba a medida que se incrementaba la frecuencia de estimulación, observándose el mismo comportamiento en la corteza. Los datos obtenidos indicaban que la vía paralemniscal estaría optimizada para el procesamiento temporal de la información de las vibrisas en torno al rango de frecuencia de la exploración. Al igual que ocurría en el sistema visual, se produciría un procesamiento paralelo de distintas cualidades de la información (somatosensorial en este caso): la información espacial sería vehiculada por la vía lemniscal a través del VPM, y la información temporal de baja frecuencia por la vía paralemniscal a través del Po. Pero este estudio se había hecho en condiciones de estimulación pasiva de vibrisas y por tanto sólo exploraba el tacto pasivo.

Usando un protocolo desarrollado por Zucker y Welker en 1969 según el cual se inducía el movimiento artificial de las vibrisas en ratas anestesiadas estimulando eléctricamente en nervio facial, se investigó qué información era vehiculada por las neuronas del ganglio del trigémino durante el tacto activo (Szwed y cols., 2003). Después investigaron cómo estas neuronas codificaban la coordenada horizontal de la posición de un objeto descubriendo que, durante el tacto activo, las neuronas del ganglio trigeminal codificaban cuatro eventos específicos: batido de vibrisas, contacto con objeto, presión ejercida contra el objeto y separación del objeto. Las neuronas del whisking codificaban la posición de las vibrisas con gran precisión disparando ante ángulos de deflexión específicos. Las neuronas de contacto codificaban la posición horizontal de un objeto “by spike timing relative to whisking onset”. Utilizando el mismo método estudiaron más tarde cómo estas señales eran vehiculadas a través del tálamo (Yu y cols., 2013). Mostraron cómo cada una de las vías aferentes originadas en el sistema de vibrisas vehiculaba aspectos distintos relacionados con el tacto activo: whisking, a través del Po (paralemniscal); contacto, a través del VPMvl (extralemniscal) y una combinación de ambos a través del VPMdm (lemniscal). También vieron que estas tres vías aferentes no respondían de forma sincrónica, disparando primero las neuronas del VPMdm en cada ciclo de whisking. Las respuestas del VPMdm eran tónicas, mientras que en los otros dos no. Estos datos cómo el Po estaba implicado en el procesamiento temporal relacionado con el control sensorimotor del movimiento de las vibrisas y, junto al VPMvl, también estaba implicado en el procesamiento temporal de la localización de objetos, llevando la señal de referencia.

Aparte de la influencia cortical, otra de las razones por las que las neuronas del Po responden de forma débil y tardía a la estimulación de las vibrisas se empezó a vislumbrar al describirse sinapsis gabaérgicas de gran tamaño, provenientes de la zona incerta ventral, sobre el soma y dendritas proximales de las neuronas talamocorticales del Po (Barthó y cols., 2002). Previamente ya se había descrito que la mayoría de los axones trigeminales que inervaban el Po también inervaban la Ziv (Veinante y cols., 2000). Estudios electrofisiológicos posteriores demostraron que las neuronas de la Ziv participaban en un circuito inhibitorio de anteaalimentación que hacía las veces de compuerta para la información proveniente de las vibrisas de forma que, silenciando la Ziv se reinstauraba una transmisión sensorial de latencia corta a través del Po (Trageser y Keller, 2004; Lavallée y cols., 2005). Así, se ha propuesto que el relevo de

información de las vibrisas a través del Po depende de un mecanismo de desinhibición (inhibición de la vía inhibitoria incerto-talámica). Se ha demostrado que esta desinhibición de la vía incertotalámica podría producirse tanto por las aferencias desde la corteza motora de vibrisas (Urbain y Deschenes, 2007), como por los aferentes colinérgicos troncoencefálicos (Masri y cols., 2006; Trageser y cols., 2006; Sobolewski y cols., 2015). A la luz de estos resultados, la transmisión de información a través del Po estaría facilitada por la actividad motora y por los estados de alerta.

3.3.3. El Po en la comunicación transtalámica entre S1 y S2

En un estudio in vitro realizado en el ratón, Lee y Sherman (2008) pudieron demostrar que el tipo de respuesta obtenida en la capa 4 de S2 tras estimular el Po era distinta a la obtenida tras estimular la vía corticocortical directa desde la capa 6 de S1. En el primer caso observaron una respuesta típica de las proyecciones directrices, consistente en la depresión por pares de pulsos y la ausencia de activación de receptores metabotrópicos. En el segundo caso obtuvieron, sin embargo, una respuesta facilitadora típica de las proyecciones moduladoras. Para comprobar si esta información transmitida por el Po a S2 era de origen cortical, Theyel y Sherman (2010) estimularon eléctricamente S1BF en rodajas del cerebro del ratón donde se había interrumpido la comunicación cortico-cortical directa con S2, y observaron mediante fluorescencia de flavoproteína que S2 se activaba de forma muy robusta. Mediante la inyección de glutamato también demostraron que la activación de S2 sólo se producía al activar las neuronas de la capa 5b de S1BF, y no las de la capa 6. Además, la activación de S2 desaparecía si se inhibía el Po. Con estos experimentos, pudieron demostrar la implicación directa del Po en el relevo de información ascendente entre áreas corticales. Puesto que, además de a S2, el Po también proyectaba a S1, en un estudio posterior se propusieron comparar las propiedades sinápticas de las proyecciones del Po a estas dos áreas (Viaene y cols., 2011). Tras estimular el Po observaron que los patrones de respuesta obtenidos en S1 y S2 eran distintos. En S1 obtuvieron facilitación, EPSPs iniciales pequeños, un perfil de activación gradual y la activación de receptores metabotrópicos. Por el contrario, en S2 observaron depresión, EPSP iniciales grandes, respuestas de tipo todo o nada y ausencia del componente metabotrópico. En base a estos resultados los autores sugirieron que, más que constituir una ruta paralela para vehicular determinados aspectos de la información somestésica a la corteza cerebral, las proyecciones del Po a S1 tendrían un

carácter modulador sobre la información vehiculada por el VPM. La información directriz sería la transmitida a S2 y provendría de S1.

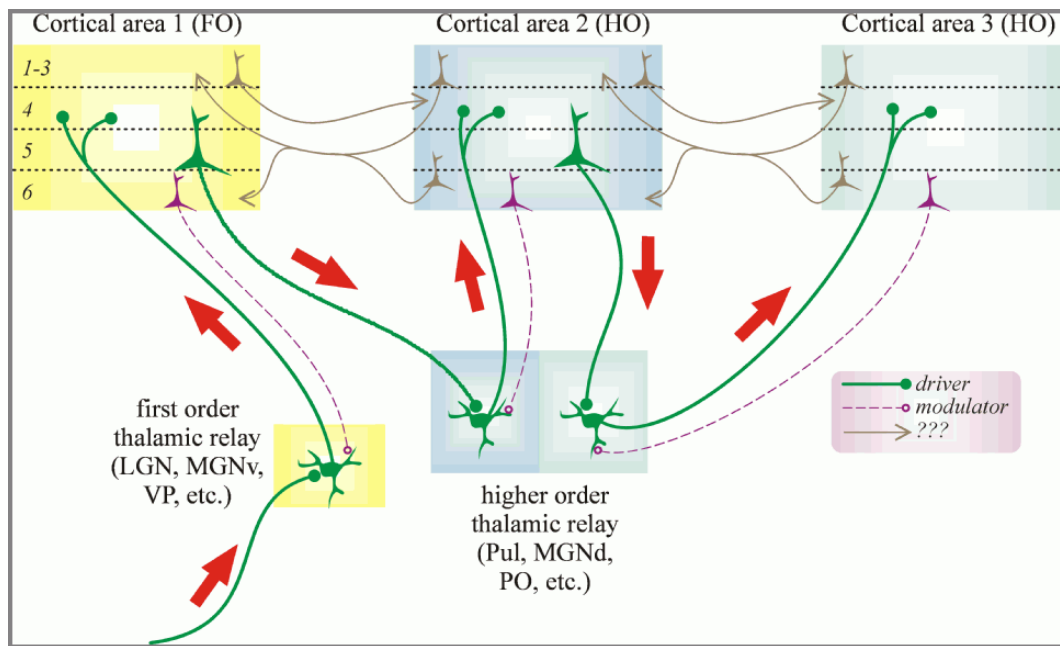


FIGURA 15: Aferencias directrices y moduladoras y eferencias de los núcleos talámicos de primer orden y de orden superior.

3.3.4. El Po como núcleo integrador

Como acabamos de ver, diversos estudios han demostrado que el Po recibe aferencias directrices tanto corticales como subcorticales. Mientras que las aferencias subcorticales se encargarían de vehicular aspectos dinámicos de la información somestésica bajo control motor y/o atencional, las aferencias corticales estarían vehiculando la información somestésica procedente de S1 para su procesamiento en áreas corticales asociativas como S2. Sin embargo, ninguno de estos estudios había podido precisar la distribución en el núcleo de ambos tipos de aferencias. En un trabajo reciente, Groh y cols. (2013) observaron que las aferencias subcorticales predominaban en las regiones rostrales del núcleo y que, en algunas zonas, estas aferencias subcorticales convergían con las aferencias de origen cortical. Más importante aún, combinando experimentos de microscopía electrónica con optogenética y electrofisiología en vivo, comprobaron que ambas aferencias directrices podían converger de forma sinérgica en una misma

neurona , provocando un aumento supralinear de la respuesta cuando eran activadas de forma simultánea.

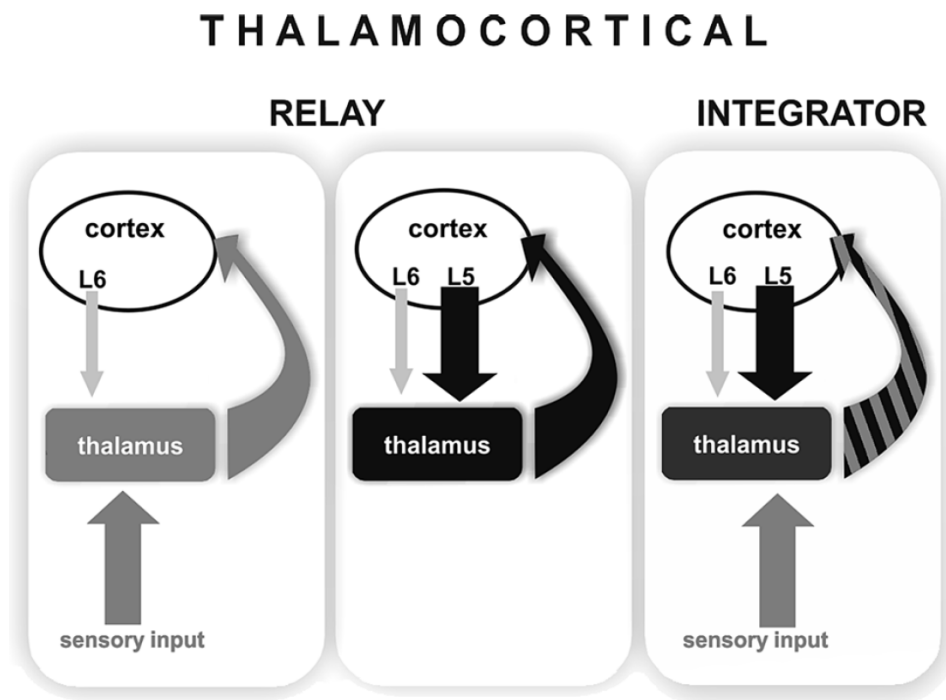


FIGURA 16: Esquema de los distintos modos de procesamiento de la información a través del tálamo

3.3.5. Función de las proyecciones estriatales

En cuanto a las proyecciones estriatales, Alloway y cols (2014) han propuesto recientemente que las proyecciones del PO al estriado dorsolateral transmitirían la información somestésica esperada en la ejecución motora de comportamientos altamente repetitivos, como el batido de vibrisas. Estas proyecciones cooperarían con las proyecciones corticoestriatales procedentes de S1 y M1 para facilitar y mantener la secuencia automática de movimientos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Como hemos visto, el Po de los roedores es un núcleo del tálamo donde se procesa información sensorial bajo un poderoso control descendente directo (Groh y cols., 2013) y/o indirecto (Lavalleé y cols., 2005) desde la capa 5 cortical, relacionado con aspectos complejos de la integración sensitivo-motora. Además, recientemente se ha demostrado que esa inervación cortical desde la capa 5 le permite actuar como un relevo transtalámico de información entre áreas corticales (Theyel y cols., 2010). Por ello se considera actualmente como arquetipo de los núcleos talámicos de orden superior, al que se ha comparado incluso con el complejo pulvinar de los primates.

Los datos obtenidos hasta la fecha mediante el marcado y la reconstrucción de neuronas individuales en el Po de la rata (Deschenes, 1988; Nosedá y cols., 2011; Ohno y cols., 2012) indican que los axones de la mayoría de estas neuronas son multiespecíficos.

Sin embargo, estos estudios no han intentado correlacionar sistemáticamente la distribución de las arborizaciones axónicas en la corteza y en el estriado con su origen dentro del Po. Conocer esta correlación es fundamental para entender el flujo de información entre el Po y la corteza cerebral. Por ello nos planteamos realizar un análisis específicamente orientado a determinar las arquitecturas axónicas y la organización de las neuronas de proyección multiespecífica del Po.

Las áreas somatomotoras de la corteza del ratón C57BL/6 presentan representaciones somatotópicas muy estereotipadas en su tamaño y posición en la convexidad lateral del hemisferio, donde son fácilmente accesibles (Paxinos, 2001), resultando así un modelo idóneo para explorar sin necesidad de realizar un registro electrofisiológico paralelo en múltiples áreas, la lógica que rige la distribución en la corteza de las arborizaciones talamocorticales.

Teniendo en cuenta estas consideraciones nos propusimos los siguientes objetivos:

1. Explorar a nivel de neuronas individuales la morfología axónica de las neuronas del núcleo posterior del ratón para valorar su semejanza con los datos publicados en las mismas neuronas de la rata

2. Mapear sistemáticamente la correlación existente entre la localización de las neuronas dentro del núcleo y la distribución de sus axones en las múltiples áreas corticales y subcorticales que inervan.
3. Determinar si existen diferencias en la distribución laminar de los axones del Po en las distintas áreas que inervan
4. Explorar la posible existencia de diferencias en el tamaño de las varicosidades axonales en las distintas áreas y láminas corticales inervadas por los axones del Po

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

El modelo animal escogido para realizar nuestro estudio ha sido el ratón *Mus musculus* perteneciente a la cepa C57BLACK6 (C57BL/6), de los que se han utilizado un total de 243 ratones adultos de entre 3 y 12 meses de edad, y con pesos comprendidos entre los 27 y los 35 gr. Estos animales fueron obtenidos y estabulados en el Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid y se realizaron de acuerdo con las directrices europeas (Decreto 86/609/EEC) y españolas (R.D. 1201/2005 del 10 de octubre)

Aunque desde los años 80 el modelo animal más utilizado en los estudios de trazado de vías nerviosas ha sido la rata, los recientes estudios a gran escala sobre estructura cerebral y conectómica (Allen Brain Map, HBP), al igual que la mayoría de estudios ontológicos y farmacológicos actuales, se desarrollan en modelos de ratón. Esto es debido a que, además de su fácil estabulación, reproducción y bajo coste, el ratón es una especie muy fácilmente manipulable desde un punto de vista genético y de la que se encuentran disponibles una enorme cantidad de líneas transgénicas. El desarrollo y aplicación de técnicas de trazado de vías en el ratón pueden generar así resultados de gran utilidad, al ponerse en el contexto de muchos estudios recientes y servir de base para estudios futuros. Por otra parte, en estudios extensos y detallados de trazado y mapeo de conexiones, como el que nos ocupa, es preferible el uso del ratón, ya que el menor tamaño de su cerebro optimiza el funcionamiento de los trazadores y simplifica notablemente el procesamiento histológico y el análisis de los resultados.

2. PROTOCOLOS GENERALES DE ANESTESIA, CIRUGÍA Y PERFUSIÓN

Antes de la cirugía se realizó una inducción anestésica del animal mediante la inyección intraperitoneal de una solución salina de 0,075 mg/g de ketamina (Ketolar®, Parke – Davis) y 0,02 mg/g de xilacina (Rompun®, Bayer). Tras comprobar que los reflejos estaban abolidos se rasuró la cabeza y se colocó al animal en un aparato para cirugía estereotáxica encefálica adaptado para animales pequeños (Kopf®, David Kopf

instruments, Tujunga, California). Las cirugías se realizaron con anestesia gaseosa de Isoflurano al 0.5 – 2% en un flujo de O₂ de 0,5 – 1L/min, que era administrada mediante un aparato de anestesia inhalatoria veterinaria adaptado a pequeños animales (RX Cisneros S.L. Electromedicina) a través de una máscara de fijación especial para ratones (Kopf®, David Kopf instruments, Tujunga, California). El isoflurano sobrante era conducido a un contenedor de carbono activo mediante una bomba de vacío (Fluovac system, Harvard Apparatus, Massachusetts, USA) Para evitar la hipotermia se situó bajo el animal una manta de agua circulante a 37°C (T-Pump®, Gaymar Industries, Orchard Park, New Jersey, EEUU), y para proteger las córneas de la desecación se aplicó sobre ellas vaselina líquida. En cirugías con una duración superior a 1h y/o en caso de hemorragia se hidrató a los animales con 1 o 2 inyecciones subcutáneas de suero salino (1-2 ml/g.)

Tras comprobar nuevamente que el animal estaba arrefléctico se aplicó sobre la piel de la cabeza una solución antiséptica de povidona iodada (Betadine®, Viatriis, Burdeos, Francia) y, con un bisturí, se realizó una incisión longitudinal en la piel, a nivel de la línea media. A continuación se rebatió la piel y la galea aponeurótica, dejando expuesto el cráneo. En aquellos casos donde había que aplicar el trazador en regiones muy laterales del hemisferio cerebral, se prolongó la apertura cutánea lateralmente y se desinsertó el músculo temporal mediante disección roma para evitar un sangrado excesivo. Tras comprobar que los puntos de referencia bregma y lambda se encontraban a la misma distancia vertical, se localizaron sobre la superficie del cráneo las coordenadas anteroposterior (tomando bregma como punto de referencia) y mediolateral (desde la línea media) de nuestra región de interés (Franklin y Paxinos, 2001), se realizó una pequeña craneotomía utilizando una trepanadora (Dremel® modelo 225, Dremel Europe) para reducir el espesor del hueso y un bisturí para cortar y levantar la lámina ósea restante sin dañar las meninges.

Una vez finalizada la aplicación del trazador, se taponó la craneotomía con gelatina hemostática (Espongostan Film; Ferrosan A/S, Søborg, Dinamarca) humedecida en suero salino y se suturó la piel con hilo de seda trenzada esteril 2/0 (Lorca-Marín, Murcia, España).

Para recuperar al animal de la anestesia, se le dejó ventilando con oxígeno al 100% a un flujo de 1L/min durante unos 15 segundos y se le mantuvo sobre la manta térmica hasta que empezaba a moverse.

Transcurrido el periodo de supervivencia necesario para asegurar el transporte axonal completo de los trazadores, se administró a los animales una dosis letal de pentobarbital sódico (80mg/Kg). Tras comprobar que los reflejos ante estímulos dolorosos estaban abolidos se abrió la cavidad abdominal y se cortó el diafragma y la parrilla costal, dejando expuesto el corazón. A continuación se retiró el pericardio y se introdujo en el ventrículo izquierdo una aguja hipodérmica de 25G con el borde romo acoplada a una bomba peristáltica (MasterFlex, Cole-Palmer®). Acto seguido se perfundio al animal con suero salino tamponado isotónico durante 1 minuto, para retirar la sangre del sistema vascular y, a continuación, se perfundió con una solución fijadora de paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato (PB) 0,1M a pH7,4. Después de su extracción, el encéfalo fue postfijado en la misma solución fijadora a 4°C durante 12-24 horas.

3. TÉCNICAS DE TRAZADO POBLACIONAL

En el presente trabajo hemos abordado el estudio detallado y sistemático de las proyecciones del núcleo posterior utilizando tres técnicas de trazado diferentes y complementarias: el trazado anterógrado poblacional, el trazado retrógrado simple, doble y triple, y el trazado de neuronas aisladas.

3.1. Técnicas de trazado anterógrado

Para realizar los experimentos de trazado anterógrado poblacional escogimos como trazador el Dextrano Biotinilado (BDA) de 10Kda (10000-lysine fixable, Molecular Probes, Eugene OR, USA) diluido al 3% en tampón fosfato 0.01M a Ph7.4. Este trazador se transporta fundamentalmente de forma anterógrada y, cuando se aplica mediante iontoforesis, produce un buen relleno del árbol axónico y de sus terminales (Reiner y cols., 2000). Se ha usado ampliamente en numerosos laboratorios, incluido el nuestro, y frente a otros trazadores como la PHA-L tiene la ventaja de poder ser amplificado y revelado sin la necesidad de utilizar anticuerpos primarios.

3.1.1. Realización de depósitos extensos de BDA

En una primera serie de experimentos (n = 10), nos propusimos realizar depósitos de tamaño mediano (~ 500 µm de diámetro mayor) que abarcasen una porción amplia del núcleo pero que quedasen confinados en él. Para realizar los depósitos del trazador

utilizamos pipetas de tubo capilar de borosilicato (FHC, Bowdoinham, ME, USA) con un diámetro externo de 0.75 mm y con un filamento de vidrio en su interior para facilitar el relleno con el trazador. Los tubos capilares habían sido estiradas previamente con un estirador vertical (Modelo 700c, David Kopf instruments, Tujunga, California) de forma que el diámetro de los primeros 5 mm de pipeta fuese inferior a 100 μ m, evitando así dañar en exceso la corteza cerebral durante su descenso en el tejido. El extremo de la pipeta se cortó bajo lupa utilizando un bisturí y ajustando el poro a un diámetro de 10-20 μ m. El tamaño del poro se comprobó en un microscopio óptico Nikon Eclipse E600 que tenía acoplada una cámara digital (Nikon DMX1200), bajo un objetivo de 40x y utilizando las herramientas de medida del software AnalySIS® 3.1

Tras rellenar la pipeta con el trazador (por capilaridad, desde el extremo opuesto a la punta y con la ayuda de una vibrisa de gato), ésta se acopló a la torre estereotáxica y se situó sobre la coordenada de interés (Franklin y Paxinos, 2001). Una vez retirada la duramadre (utilizando una aguja hipodérmica con el extremo doblado en forma de gancho), se introdujo la pipeta lentamente hasta la coordenada vertical seleccionada (Franklin y Paxinos, 2001). A continuación se inyectó el trazador mediante iontoforesis, aplicando una corriente positiva de 3 μ A durante 10 minutos en ciclos de 7seg. on/off a través de electrodos conectados a una fuente de corriente continua (Midgard, Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA). La alternancia de ciclos con paso y sin paso de corriente era importante para evitar el colapso de la punta por la atracción de macromoléculas cargadas negativamente y también para minimizar el daño causado por la corriente en el tejido.

Al finalizar la inyección, dejamos reposar la pipeta en el sitio durante 10 minutos, para evitar el reflujo del trazador. Pasado ese tiempo se extrajo lentamente y se comprobó con el microscopio que el diámetro de la punta no se había alterado.

Para asegurar un relleno óptimo de los axones se estimó un tiempo de supervivencia de 7 días

3.1.2. Realización de microdepósitos de BDA

En una segunda serie mucho más extensa de experimentos (n = 65) nos propusimos realizar un muestreo exhaustivo y con valor poblacional de los patrones de arborización que presentaban las NTPs localizadas en diferentes subregiones del núcleo. Dadas las pequeñas dimensiones del Po en el ratón, era necesario realizar depósitos más o menos

esféricos muy pequeños, de entre 50 -200 μm (diámetro mayor) desde los que se obtuviera un buen transporte del trazador. Para conseguir nuestro objetivo, utilizamos la estrategia empleada por Pinault en las inyecciones yuxtacelulares de biocitina (Pinault, 1996) . Esta estrategia consistía en reducir el diámetro de la punta de la pipeta, utilizar corrientes bajas (del orden de nanoamperios) y aumentar el tiempo de inyección utilizando, a su vez, ciclos cortos. Tras probar con diferentes combinaciones de parámetros encontramos que los mejores resultados se obtenían con puntas de entre 4 y 5 μm de diámetro, una corriente de 200 nA, obtenida mediante una fuente de corriente continua (Dual Current 260, World Precision Instruments), y un tiempo de inyección de 40 minutos en ciclos de 1seg. on/off . Con estos parámetros conseguimos realizar depósitos de entre 50 – 200 μm (diámetro mayor) provocando escasos daños en el tejido y obteniendo un relleno axonal mucho más efectivo que el obtenido con los depósitos medianos. Por lo demás, el procedimiento para la inyección del trazador es el que aparece descrito en el apartado anterior.

3.2. Técnicas de trazado retrogrado

Para realizar los experimentos de trazado retrógrado se utilizaron cuatro trazadores fluorescentes visibles con microscopía de epifluorescencia y lo suficientemente fotoestables para permitir su análisis exhaustivo sin una pérdida significativa de fluorescencia, incluso meses después de haber sido procesados (Tabla 2). Dos de estos trazadores estaban basados en compuestos inorgánicos: Fast Blue (FB) (diamidino compound 253/50, Dr. Illing GmbH & Co. KG) y Fluoro-Gold (FG) (methanesulfonato de hydroxystilbamidina, Molecular Probes, Oregon, USA) y los otros dos estaban formados por la subunidad B de la toxina cólica (CTB) conjugada con 2 dyes de la familia Alexa: CTB - A594 y CTB - A488 (Molecular Probes, Oregon, EEUU)

El FB y el FG son captados por terminales nerviosas y por neuritas dañadas, y suelen producir cierta necrosis tisular en el lugar donde son depositados. No obstante, este hecho parece no afectar al transporte retrógrado. Desde el lugar de captación, estos trazadores son transportados en vesículas hasta el soma neuronal. Una vez allí, el FB marca el citoplasma y el inicio de las dendritas (Bentivoglio y cols., 1980), y el FG el núcleo, el citoplasma y las dendritas (Schmued y Fallon, 1986). Estos trazadores son especialmente útiles para realizar depósitos grandes.

Las CTB-Alexas son captadas por la unión de la CTB a receptores específicos de membrana (Trojanowski, 1983) y son transportadas en vesículas hasta el soma, donde marcan el citoplasma (Conte y cols., 2009). A diferencia del FB y del FG, estos trazadores parecen funcionar bien en depósitos pequeños y son especialmente útiles en experimentos de doble marcado, al no solaparse sus espectros de emisión (Conte y cols., 2009)

Debido a la diferente naturaleza de estos trazadores las formas de aplicación para conseguir un marcado óptimo fueron también distintas:

3.2.1. Depósitos aplicados en superficie

En la mayoría de los casos, los depósitos de FB se realizaron mediante la aplicación sobre la superficie cortical de pequeños fragmentos (>1mm) de papel de filtro (Whatman®, Whatman Internacional, Maidston, Inglaterra) impregnados con el trazador diluido al 1% en agua destilada. Esta técnica es una modificación de la técnica de depósito epipial utilizada previamente en la rata (Rubio y cols., ...). En este caso, la aplicación del depósito se realizó tras retirar la piamadre, garantizando así la penetración del trazador hasta las capas intermedias de la corteza. La aplicación del trazador mediante esta técnica es de especial utilidad a la hora de realizar depósitos en áreas extensas de corteza.

3.2.2. Inyecciones de trazador por presión

En los casos donde se requerían depósitos pequeños, se realizaron inyecciones volumétricas controladas de FB o de coleratoxinas. Para ello se rellenaron pipetas de borosilicato con una dilución de FB al 0,2% en tampón cacodilato 0,1M a pH 7,3, o bien con una dilución de las coleratoxinas al 0,1% en tampón fosfato 0,1M a pH 7,3. La preparación y el relleno de las pipetas se realizaron tal y como aparece descrito en el apartado anterior, ajustando esta vez el poro a un diámetro de 20-30 μm . Después de rellenarse con el trazador y tras comprobar que no quedaban burbujas de aire en su interior, conectamos la pipeta a una electroválvula Picospritzer II (General Valve Corporation, Fairfield, NJ) y la situamos estereotáxicamente sobre la coordenada de interés. A continuación inyectamos un volumen de 0,01-0,1 μl del trazador mediante sucesivos pulsos de presión de 10-20 ms a 0,5-3 bares.

3.3.3. Inyecciones iontoforéticas

Los depósitos de Fluorogold se realizaron mediante inyecciones iontoforéticas. Para llevarlas a cabo se rellenaron pipetas de borosilicato con una dilución del trazador al 0,5-1,5% en tampón fosfato 0.1M a pH 7,3 y se procedió según el protocolo descrito para las inyecciones medianas de BDA.

Tabla 2. Casos válidos obtenidos de los experimentos de trazado retrógrado

CASO	TRAZADORES	MÉTODO	LOCALIZACIÓN	COMENTARIO
RR01	FB (2%) FG(0.75%)	Papel impregnado lontoforesis	S1Wr/Hpaw S1BF(A4-5, B4-5)	Posible contaminación S1Dz
RR02	FB (2%) FG (0.75%)	Papel impregnado lontoforesis	S1BF(E5-9, D5-9) AGIFL-Wk	Contaminación vibrisas rostrales
RR03	FB (2%) FG (0.75%)	Papel impregnado lontoforesis	S1BF (E3-4, D4)/Dz/Wr/Arm AGIWk	
RR04d	FB (2%) FG (1.5%) CTB-A594 (0.5%)	Papel impregnado lontoforesis lontoforesis	AGLWk-FL/AGm S1BF(C6-7,D6-7) S2FL	No hay transporte
RR04i	FB (2%) FG (1.5%) CTB (0.5%)	Papel impregnado lontoforesis lontoforesis	S1BF(D4,E3-4)/S1Dz AGLFL S2Wk	Posible contaminación S1Arm Contaminación S1HL No hay depósito
RR05	FB (2%) FG (1.5%) CTB-A594 (0.5%)	Papel impregnado lontoforesis lontoforesis	FR S1Fpaw/Dígitos 4-5 S2Dígitos	Sólo 4-5 neuronas No hay transporte
RR06	FB (1%) FG (0.75%) CTB-A594 (0.5%)	Papel impregnado Picospritzer lontoforesis	S2HL/ PVbody AGIFL AGm	Contaminación A2 Escaso transporte/Autofluoresc. No hay transporte
RR07d	FB (1%)	Papel impregnado	V1	
RR07i	FB (1%)	Papel impregnado	AGm	
RR08	FB (1%)	Papel impregnado	AGTrk/HL	Contaminación S1trk y RSA
RR09	FB (0.2%)	Picospritzer	S1Wr	Escaso transporte
RR12	FG (0.75%) FG (0.75%) FB (0.1%)	lontoforesis lontoforesis Picospritzer	AGlrostral AGlcaudal S1vibrisas rostrales	No hay transporte
RR15d	FB (0.1%) FG (0.75%)	Picospritzer lontoforesis	S1BF (D7-E8) S1BF (D8-10, C9)	Solapamiento
RR15i	FB (0.1%) FG (0.75%)	Picospritzer lontoforesis	S1BF (E6-7, D6-7) S1BF (E1-3, D1)	Contaminación en S1Dz Contaminación en S1Dz

RR16	FB (0.1%)	Picospritzer	S1 lower jaw	
RR17	FB (0.1%)	Picospritzer	S1 Chew	Contaminación Agl lip
RR26	FB (1%)	Papel impregnado	S2 VR/FL	
RR27	FB (1%)	Papel impregnado	S2rostral/FL	
RR29d	FB (1%)	Papel impregnado	S2rostral/Vb/FL	
RR29i	FB (1%)	Papel impregnado	AGljaw/tongue, AGMFL	Contaminación FR
RR30	FB (1%)	Papel impregnado	S1lip/jaw	
RR31	CTB-A594 (1%) CTB-A488 (1%)	Nanoyector Nanoyector	AGIFL-Wk S1BF(E4-9, D4-10)/Dz/FL	
RR34	FB CTB-A594 CTB-A488	Papel impregnado Nanoyector Nanoyector	S2FL/HL AGLWk/FL/Jaw/tongue S1BF (E4-11,D5-10)/Dz/FL	

4. TÉCNICAS DE TRAZADO DE NEURONAS ÚNICAS

Para el trazado completo de neuronas únicas hemos utilizado el vector viral RNA Sindbis-pal eGFP, diseñado para expresar una versión modificada de la proteína verde fluorescente (eGFP) fusionada con la señal de palmitoilación y direccionamiento a membrana GAP43 (Furuta y cols., 2001). Este vector fue desarrollado y cedido a nuestro laboratorio por el grupo de Takeshi Kaneko, de la Universidad de Kyoto (Japón). La inyección de los pseudoviriones Sindbis-pal eGFP a diluciones muy bajas es, hasta la fecha, el mejor método descrito para conseguir un trazado rápido y completo de axones complejos en neuronas únicas.

4.1. Consideraciones metodológicas

En nuestros experimentos de trazado de neuronas aisladas hemos utilizado dos métodos de transfección distintos: en una primera serie de experimentos (n = 25) transfectamos las neuronas por mediación de los pseudoviriones, que inyectamos diluidos según el protocolo publicado por el laboratorio del Dr. Kaneko (Furuta y cols., 2001). Tras analizar los primeros resultados nos percatamos de que, en la mayoría de los casos, las neuronas se transfectaban en regiones alejadas al lugar de la inyección, con lo que la eficacia de los experimentos resultaba muy baja. Debido al pequeño tamaño del pseudovirión (< 700Å) y a su forma esférica, interpretamos que este resultado se debía a su desplazamiento por el líquido intersticial antes de transfectar alguna célula. Esta hipótesis se vio reforzada por el hecho de que, en aquellos núcleos que estaban

limitados por algún haz de fibras (como el ventromedial) las neuronas siempre se tranfectaban en los límites del haz, independientemente de donde se hubiese realizado la inyección. Para solventar este problema sin renunciar a las ventajas del vector Sindbis, nos propusimos desarrollar un nuevo método que nos permitiese transfectar el RNA “in vivo” en neuronas aisladas de forma directa.

4.2. Trazado de neuronas aisladas mediante la Inyección de pseudoviriones Sindbis

4.2.1. Generación y dilución de los pseudoviriones

La generación de los pseudoviriones Sindbis se llevó a cabo en el Laboratorio de Vectores ubicado dentro del Área de Terapia Génica y Hepatología del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) perteneciente a la Universidad de Navarra. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de forma conjunta con el personal del laboratorio y bajo la supervisión del Dr. Cristian Smerdou.

Para la generación de los pseudoviriones Sindbis se utilizaron 2 plásmidos: el vector Sindbis-pal-eGFP y un plásmido codificante para las proteínas estructurales (*helper*) que, en este caso, era el DH (26S). Con estos plásmidos, transformamos bacterias competentes E. Coli XL1Blue, Comprobando las colonias obtenidas mediante minipreps y análisis con enzimas de restricción. A continuación realizamos las maxipreps y obtuvimos unos 0.5mg de cada plásmido.

Al funcionar estos vectores como un virus RNA era preciso hacer una transcripción “in vitro” del ADN plasmídico. Para ello digerimos 50µg de cada plásmido utilizando la enzima NotI para los vectores y XhoI para el *helper*. A continuación comprobamos la digestión mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.7% y purificamos los ADNs molde mediante una doble fenolización y precipitación en etanol absoluto. Por último, realizamos la transcripción *in vitro* de los ADNs molde utilizando rNTPs, CAP, DTT, Rnasin y RNAPolimerasa.

Tras finalizar la transcripción “in vitro” Comprobamos la reacción mediante electroforesis e, inmediatamente, guardamos los ARNs a –80°C.

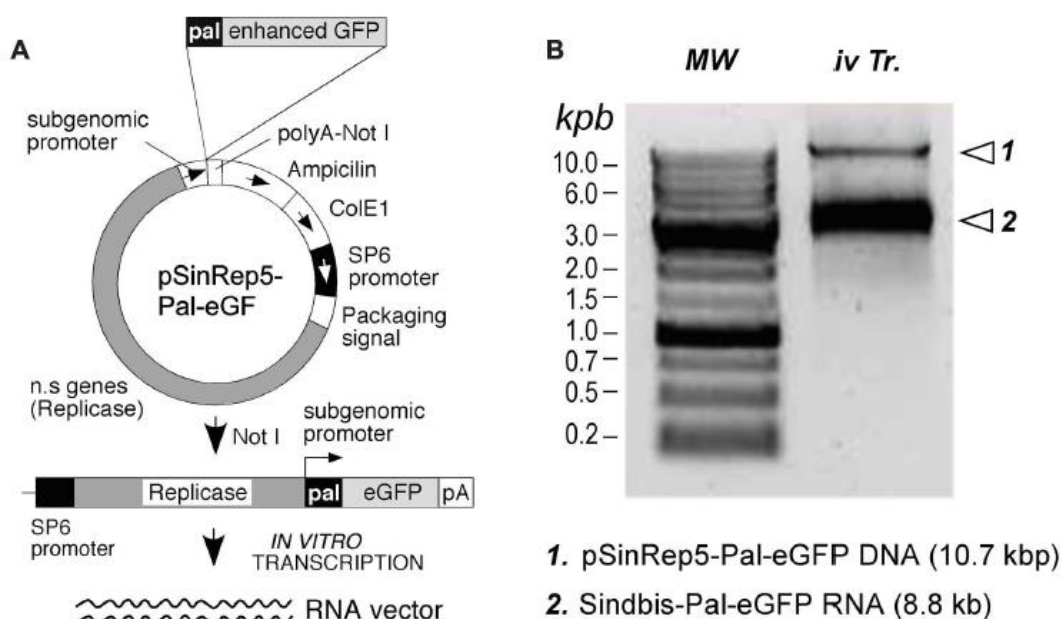


Figura 1: Producción del RNA. (A) Representación esquemática de los procesos de linealización y transcripción “in vitro” del plásmido Sindbis-Pal-eGFP. n.s genes: genes no estructurales; pA: poli-A. (B) Control de calidad por electroforesis en gel de agarosa del ADN linealizado y del ARN transcrito.

Para producir las partículas virales cotransfectamos células BHK (baby hamster kidney) electroporando los transcritos del vector viral y el *helper*. Para ello Mezclamos los dos ARNs (1:1, 25µl de cada) con 0.8ml de células BHK (10^6 células aprox.) resuspendidas en PBS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} , y electroporaremos con pulsos de 850V/25µF (BioRad). Diluimos las células (1/20) en medio BHK completo (GMEM) e incubamos 24h a 37°C. Recogemos el medio y lo centrifugaremos 15' a 2000g. Concentramos las partículas ultracentrifugando a 30000rpm en un rotor SW40Ti durante 90' a 4°C sobre un colchón de sacarosa al 20%. Decantamos los sobrenadantes y recogimos los virus resuspendiendo el *pellet* en 1ml de buffer TNE. Alicuotamos (10µl) en criotubos y los congelamos inmediatamente en nitrógeno líquido. Utilizamos una de las alícuotas para titular. Para ello incubamos células BHK en pocillos con cubreobjetos estériles, con diluciones seriadas del virus (10^{-1} a 10^{-6}) a 37°C durante 24h. Fijamos con paraformaldehído y contamos el número de células transfectadas en un número representativo de campos utilizando un microscopio de fluorescencia.

4.2.2. Inyección de los pseudoviriones

Para inyectar los pseudoviriones introducimos en el cerebro una micropipeta de borosilicato con una punta de entre 20 y 30 μm de diámetro cargada con una dilución de 10^5 partículas virales/ml en PBS al 0.05% + BSA al 0.5%. A continuación inyectamos lentamente por presión (Picospritzer II General Valve Corporation, Fairfield, NJ) un volumen aproximado de 0.05 μl de la solución viral, que contenía una cantidad estimada de 10-100 partículas infectantes. Una vez completada la inyección esperamos 10 minutos antes de retirar la pipeta. Finalmente cerramos la craneotomía con espongostán y suturamos la piel.

El tiempo de supervivencia estimado para tener un trazado óptimo en los experimentos de transfección con el vector Sindbis está entre las 48 y 60h. En este intervalo, la célula habrá tenido tiempo para producir la suficiente cantidad de proteína fluorescente como para marcar completa e intensamente el árbol axónico sin ver comprometida su supervivencia

4.3. Desarrollo de un nuevo método simple y eficiente para transfectar RNA “in vivo” en neuronas únicas de cerebros adultos

4.3.1. Antecedentes

En la última década, se han desarrollado y aplicado con éxito diferentes métodos de electroporación para introducir DNA plasmídico en grandes poblaciones neuronales de roedores prenatales y, en menor medida, de roedores adultos (Revisado en De Vry y col., 2010). Todas estas técnicas se basan en la inyección volumétrica de DNA en el sistema ventricular, o en regiones relativamente superficiales del parénquima nervioso, seguida de la aplicación de pulsos de corriente negativa, con el fin de permeabilizar durante un breve periodo de tiempo la membrana celular y promover el paso del DNA a su través. La diferencia entre ellas radica, principalmente, en los parámetros eléctricos utilizados, los tipos de electrodos y la ubicación de los mismos. Su eficacia, en cualquier caso, es muy elevada.

Pese a que en los últimos años se ha extendido el uso de las técnicas de electroporación para transfectar “in vivo” DNA en poblaciones neuronales, su uso en neuronas aisladas se había limitado a cultivos celulares u organotípicos, o a especies pequeñas y

translúcidas, como el renacuajo (REF). Esto era debido, fundamentalmente, a la necesidad de trabajar bajo guía visual para poder identificar y transfectar una neurona concreta. Aunque recientemente se han publicado algunos métodos para electroporar con DNA neuronas aisladas en el cerebro de roedores adultos, la necesidad de visualizar o registrar electrofisiológicamente la neurona diana impone la utilización de equipos complejos y costosos como microscopios de doble fotón (Marshall y cols., 2010; Kitamura y cols., 2008) o sistemas de registro en patch-clamp (Ranc y cols., 2011; Oyama y cols., 2013). Además, el uso de estas técnicas está limitado a regiones fácilmente accesibles del sistema nervioso, como la corteza cerebral, y su eficacia en comparación a la electroporación poblacional es muy baja. Por último, salvo unos pocos estudios realizados con RNA de interferencia (REFS), la electroporación de vectores RNA no se ha explorado todavía.

4.3.2. Procedimiento

Para poder trazar neuronas talamocorticales aisladas con el vector Sindbis necesitábamos desarrollar un método sencillo y eficaz que nos permitiese electroporar RNA en neuronas aisladas de una estructura profunda como es el tálamo sin utilizar guía visual ni registro. Basándonos en protocolos previos (REF), decidimos probar con un abordaje experimental donde la pipeta cargada con el ácido nucleico hiciese las veces de electrodo negativo, mientras que el electrodo positivo quedaría en contacto con el cráneo y a la menor distancia posible de la punta de la pipeta.

Después de situar al animal anestesiado en el aparato estereotáxico y abrir la piel y el hueso, cubrimos la zona de la corteza expuesta con esponja hemostática empapada en suero salino para evitar que se seque. A continuación descongelamos en hielo una alícuota de 5µl de RNA y cargamos con ella una pipeta de borosilicato. Lo hacemos por capilaridad, desde atrás y ayudándonos de un hilo de plata. Inmediatamente después, colocamos la pipeta en un soporte para electrodo acoplado al marco estereotáxico, de forma que el hilo de plata esté en contacto con la solución de RNA.

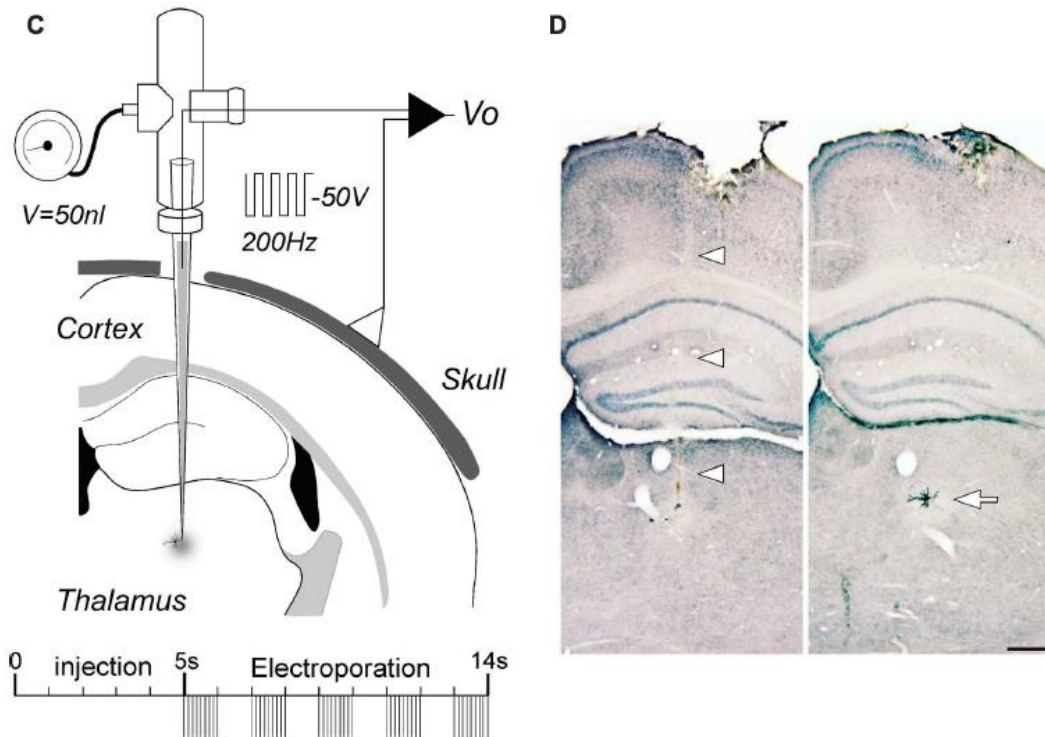


FIGURA 2. Procedimiento seguido para la transfección del RNA libre. (A) Diagrama esquemático del protocolo. Ver los detalles en el texto. (B) Imágenes de campo claro de dos secciones coronales adyacentes donde se muestra el rastro dejado por la pipeta en el tejido (cabezas de flecha) y la neurona transfectada (flecha). El marcado producido por la proteína GFP fue estabilizado e intensificado mediante inmunohistoquímica (ver texto). Las referencias citoarquitectónicas en el tejido se obtuvieron mediante una contratinción suave de tionina. Barra de calibración: 250 μ m

Para evitar la degradación del RNA por acción de las RNAsas todos los procedimientos se realizaron sobre superficies limpias. Se utilizaron guantes limpios y mascarillas quirúrgicas cada vez que se iba a manejar el RNA y el instrumental metálico y los electrodos fueron flameados antes de entrar en contacto con el RNA. Por último, las pipetas se mantuvieron en estufa a 280°C un mínimo de 15 horas.

4.3.3. Protocolos experimentales testados y resultados obtenidos con ellos

En primer lugar intentamos transfectar el RNA utilizando solo pulsos de corriente, sin inyectar la solución de RNA en el tejido (Pr1-3) (tabla X). En concreto, probamos las siguientes combinaciones de parámetros eléctricos: a) pulsos largos con corrientes de baja intensidad, similares a los utilizados para electroporar el dextrano biotinilado (Reiner et al., 2000) (Pr1); y b) voltajes altos a dos frecuencias de distintas: 200Hz (Pr2) y 1Hz (Pr3), que se han probado con éxito en algunos protocolos de electroporación de DNA plasmídico (Haas y cols., 2001; Barnabé-Heider y cols., 2008; Borrell, 2010;

Ohmura y cols., 2015). En ninguno de estos experimentos se obtuvo ningún resultados positivos.

TABLA 3. Protocolos experimentales probados en el estudio

Protoc.	Vol (nl)	NaCl (M)	poro \varnothing (μ m)	R. (M Ω)	Volt./Am p.	Hz	Pulse length	Total time	Iterations	Nº Expts	Cases with labeling
Pr1	-	-	1-10	4-9	10-200 nA	0.5	1s	5s-10m	1	9	0
Pr2	-	-	1-10	4-9	50 V	1	50ms	5s	2-5	7	0
Pr3	-	-	1-10	4-9	50 V	200	1ms	1s	2-5	7	0
Pr4	50-100	-	18-30	3-4	10-200 nA	0.5	1s	5s-10m	1	10	0
Pr5	50-100	-	18-30	3-4	50 V	1	50ms	5s	2-5	13	1
Pr6	50-100	-	18-30	3-4	10 V	1	50ms	5s	2-5	5	1
Pr7	50-100	-	18-30	3-4	50 V	200	1ms	1s	2-5	15	2
Pr8	50-100	-	18-30	3-4	10 V	200	1ms	1s	2-5	5	0
Pr9	50-100	-	18-30	3-4	80 V	200	1ms	1s	2-5	5	0
Pr10	50-100	0.5	18-30	1-2	-	-	-	-	-	13	7
Pr11	50-100	0.5	18-30	1-2	50 V	200	1ms	1s	2-5	28	24
Pr12	50-100	-	18-30	1-2	-	-	-	-	-	11	1

Al observar que el RNA tendía a precipitar y obstruir la punta de la pipeta, interpretamos que los resultados negativos podían deberse, en parte, a la dificultad para expulsarlo de la pipeta durante la aplicación de la corriente. Decidimos entonces utilizar pipetas con un poro de mayor diámetro e inyectar un pequeño volumen de la solución de RNA en el tejido justo antes de aplicar los pulsos de corriente. En concreto inyectamos por presión, y de forma controlada, un volumen de 50-100nl (Picospritzer II, Parker Hannifin, Cleveland OH). A continuación aplicamos la corriente probando con diferentes intensidades, voltajes y/o duración de los pulsos (Pr4-9, tabla X). Utilizando este abordaje obtuvimos éxito, aunque muy bajo, en algunos de los protocolos (Pr5-7). En los protocolos 5 y 6, donde aplicamos los pulsos de corriente más largos a menor frecuencia, siempre observamos que se producía una gran lesión electrolítica en la zona de inyección. Esto nos llevó a descartar estos parámetros en los siguientes protocolos, pese a que con ellos logramos transfectar alguna célula. Con el protocolo 7, donde aplicamos pulsos cortos de corriente a muy alta frecuencia, conseguimos transfectar células aisladas sin causar lesiones relevantes. Sin embargo, la tasa de éxito obtenida en

estos experimentos resultó ser demasiado baja (2/12). Esto nos llevó a explorar otros factores que pudiesen mejorar la eficacia de las transfecciones.

Hasta ahora, para mejorar la eficacia de la transfección de DNA en el tejido nervioso, solo se habían explorado modificaciones en los parámetros eléctricos o en la concentración del plásmido. Sin embargo, en las últimas décadas, diferentes autores también han investigado los efectos de la composición salina del vehículo (REFS). Recientemente, se ha observado que determinadas concentraciones de NaCl pueden aumentar la eficacia de la electroporación en células de mamíferos *in vitro* e *in vivo* (Tokudome y col., 2003; Lee y cols., 2012). En base a estos estudios decidimos comprobar si una concentración elevada de NaCl en el vehículo del vector podía incrementar la eficacia en nuestros experimentos de transfección. Para explorar este efecto añadimos 0.6µl de una solución 5M de NaCl en agua destilada-DEPC a nuestras alícuotas de RNA, obteniendo una concentración final de 0.5M de NaCl. Aumentando la salinidad del medio conseguimos, además, disminuir la resistencia al paso de corriente en la punta de la pipeta (tabla X).

En una primera serie de experimentos decidimos comprobar si una alta concentración de NaCl en el vehículo podía, por si misma, ser suficiente para transfectar el vector (Pr10). En otra serie de experimentos estudiamos si la eficacia de la electroporación aumentaba al utilizar un vehículo salino (Pr11). Tras analizar los resultados comprobamos que la mera inyección del vector en el vehículo salino era suficiente para lograr alguna transfección en un 53,8% de los casos. Eficacia significativamente mayor ($p<0,05$) a la obtenida con la inyección del vector en medio no salino (9,1%, Pr13). Si, además, aplicábamos los pulsos de corriente justo después de la inyección, la eficacia subía hasta un 85,7%, siendo significativamente mayor a la obtenida con los otros protocolos ($p<0,05$ respecto a Pr11 y $p<0,01$ respecto a los demás protocolos). Aunque probamos a utilizar concentraciones mayores de NaCl en algunos experimentos (0,8M, $n=4$; 1M, $n=6$; 1,3M, $n=3$), en estos casos la alta concentración salina provocaba la aparición de precipitados a lo largo de la pipeta que dificultaban o imposibilitaban la inyección del vector. La concentración de 0,5M resultó ser el mejor compromiso.

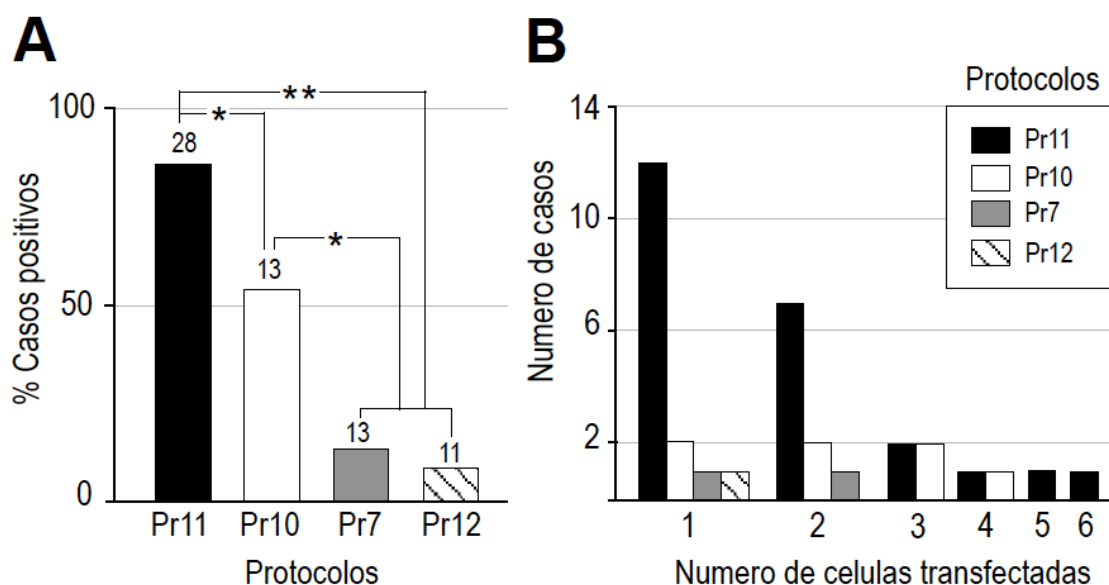


FIGURA 3. Comparación de la eficacia obtenida con diferentes protocolos de transfección probados en este estudio. (A) La eficacia de transfección de cada protocolo fue calculada como el porcentaje de casos donde se encontró expresión de GFP en alguna célula respecto a los casos totales donde se probó ese protocolo. El número de casos totales donde se probó cada protocolo aparece indicado sobre cada una de las columnas. Test de Fischer de dos colas, * $p < 0,05$, ** $p < 0.001$). (B) El número de neuronas transfectadas en cada experimento variaba entre una y seis, siendo más frecuente obtener una o dos neuronas marcadas. Ver los parámetros de cada protocolo en la **Tabla 1**.

En los protocolos con una mayor tasa de éxito (Pr10 y 11), la transfección de 1 o 2 células fue el resultado más frecuente (Figura 3B) y, al igual que en otros protocolos de transfección viral o de electroporación (Furuta y cols., 2001; Ohmura y cols., 2015), la mayoría de las células transfectadas fueron neuronas (76,5% en el Pr11 y 84,6% en el Pr10), siendo el resto células gliales.

En lo que se refiere a la precisión espacial de estos experimentos, la distancia entre la punta de la pipeta y el árbol dendrítico de la célula transfectada fue significativamente menor (distancia media = $16,1 \pm 29,6 \mu\text{m}$) a la obtenida en los experimentos de transfección viral (distancia media = $317 \pm 266,5 \mu\text{m}$; Mann-Whitney: $p < 0,01$; FIGURA...). De hecho, en la mayoría de los experimentos de transfección de RNA cuantificados (6/9), la punta de la pipeta se localizó en el radio del árbol dendrítico de la célula transfectada (distancia=0 μm), lo cual sugiere que la transfección puede darse a través de las dendritas.

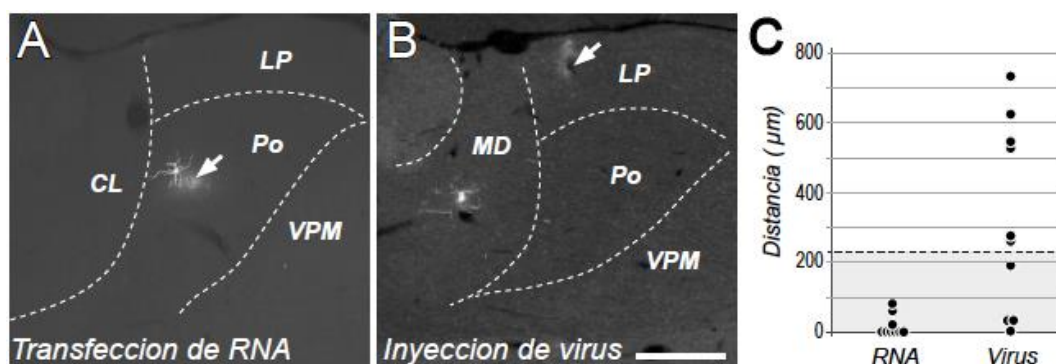


FIGURA 4. La transfección con el RNA libre siempre ocurre en la proximidad de la punta de la pipeta. Imágenes de epifluorescencia de neuronas marcadas mediante la transfección del RNA libre (A) o mediante la inyección de partículas infectivas (B). Mientras que en (A) el arbol dendrítico de la neurona transfectada es adyacente al punto de inyección (indicado mediante una flecha), la neurona transfectada en (B) se encuentra a unas 700 micras del punto de inyección (flecha). Barra de calibración: 500μm. (C) Distancias medidas entre los puntos de inyección y los dominios somatodendríticos de 9 neuronas transfectadas con el RNA libre y 10 neuronas transfectadas mediante la inyección de las partículas infectivas. Como referencia, se indica en gris el radio correspondiente a la esfera ideal ocupada por un volumen de 50nl.

5. PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO: CORTE, TINCIÓN Y MONTAJE DEL TEJIDO

5.1. Experimentos de trazado anterógrado

Tras la cirugía dejamos transcurrir un tiempo de 7 días para asegurar un transporte óptimo del trazador. Pasado este tiempo sacrificamos y perfundimos los animales tal y como aparece descrito en el apartado correspondiente. Después de post fijar los cerebros se retiraron el tronco del encéfalo y los bulbos olfatorios con una cuchilla y siguiendo el plano coronal. El bloque resultante fue crioprotegido en una solución de sacarosa al 30% en PB 0,1M durante un periodo aproximado de 24 horas, en agitación a 4°C. Tras comprobar que el cerebro se había hundido en la solución crioprotectora, éste fue cortado en el plano coronal de forma seriada a 60μm, recogándose las secciones en cajas multipocillo con PB 0,1M frío de forma ordenada y en 2 series alternas.

A continuación se procesaron ambas series de tejido con el fin de revelar el trazador. Para ello, primero se inactivó la peroxidasa endógena con H₂O₂ al 10% en PB 0,1 y después se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente (o durante una noche a 4°C) con el complejo avidina-biotina (ABC Elite, Vector Laboratories; 1 gota de A y 1 gota de B por cada 5 ml) en PB 0,1M con TX-100 al 1%. Para evitar uniones inespecíficas del complejo avidina-biotina y obtener un revelado más limpio se utilizó siempre ABC

reciclado (1 uso previo) o incubado previamente con tejido cerebral de ratón. Tras la incubación en ABC se realizó el revelado de la peroxidasa con DAB (3,3-diaminobenzidina tetrahidroclorehidrico, Sigma, Saint Louis, MO; 0,02%) intensificando con sulfato amónico de níquel (1,2% níquel sulfato, 0,02% cloruro amónico). Para evitar depósitos inespecíficos de DAB en el tejido se realizó una liberación muy controlada de peróxido de hidrógeno durante el proceso de revelado utilizando la reacción de la glucosa oxidasa (D-glucosa 0,2%, 0,003% glucosa oxidasa). La reacción de revelado se realizó en tampón acetato sódico frío y el proceso se supervisó bajo el microscopio óptico. Todo el procesamiento se realizó en flotación y en agitación.

Después del revelado se comprobó la localización de la inyección y la calidad del trazado bajo el microscopio. De aquellos casos válidos, una serie fue montada de forma ordenada sobre portaobjetos grandes (Menzel- Glaser®, Menzel GmbH & Co KG) gelatinizados, utilizando tampón fosfato 0,03M frío. Tras dejar secar al aire durante una noche, las secciones fueron contrateñidas levemente con tionina diluida 1:10 para poder realizar después una delimitación citoarquitectónica general. La otra serie fue procesada para revelar la actividad citocromo oxidasa según el protocolo de Wong-Riley (1979). Esta contratinción permitirá la delimitación precisa del Po, del VPM y de varias áreas corticales, como S1BF y S2. Brevemente, las secciones se incubaron durante 4 horas en una solución de PB 0,1 pH 7,4 con DAB, citocromo C, y sacarosa, en agitación a 37°C y protegidas de la luz. Tras comprobar al microscopio que la tinción inmunohistoquímica era lo suficientemente intensa, las secciones se montaron y se dejaron secar al aire. Una vez secas, ambas series fueron deshidratadas con inmersiones de 3 minutos en una batería etanoles de concentraciones crecientes. Finalmente, las secciones fueron aclaradas por inmersión en xileno durante 45 minutos y cubiertas con DePex (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Alemania)

5.2. Experimentos de trazado retrógrado

Al igual que en los experimentos de trazado anterógrado, el tiempo óptimo de supervivencia de los animales para asegurar un transporte completo de los trazadores retrógrados fue de 7 días. Después de la perfusión y postfijación, los cerebros fueron bloqueados, crioprotegidos y cortados siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior. Para el análisis de estos experimentos también se obtuvieron 2 series de tejido alternas. Una de estas series se destinó al análisis de la fluorescencia y, en este caso, las

secciones se montaron inmediatamente después de ser cortadas para evitar, así, la difusión de los trazadores en el tejido. Tras ser examinadas bajo el microscopio de epifluorescencia para validar el experimento, las secciones fueron deshidratadas con inmersiones de 15 segundos en una batería etanoles de concentraciones crecientes, aclaradas por inmersión de 30 minutos en xileno y montadas con DePex. En los casos válidos, la segunda serie se procesó para revelar la actividad citocromo oxidasa y poder así delimitar con precisión la localización de los depósitos y del marcado

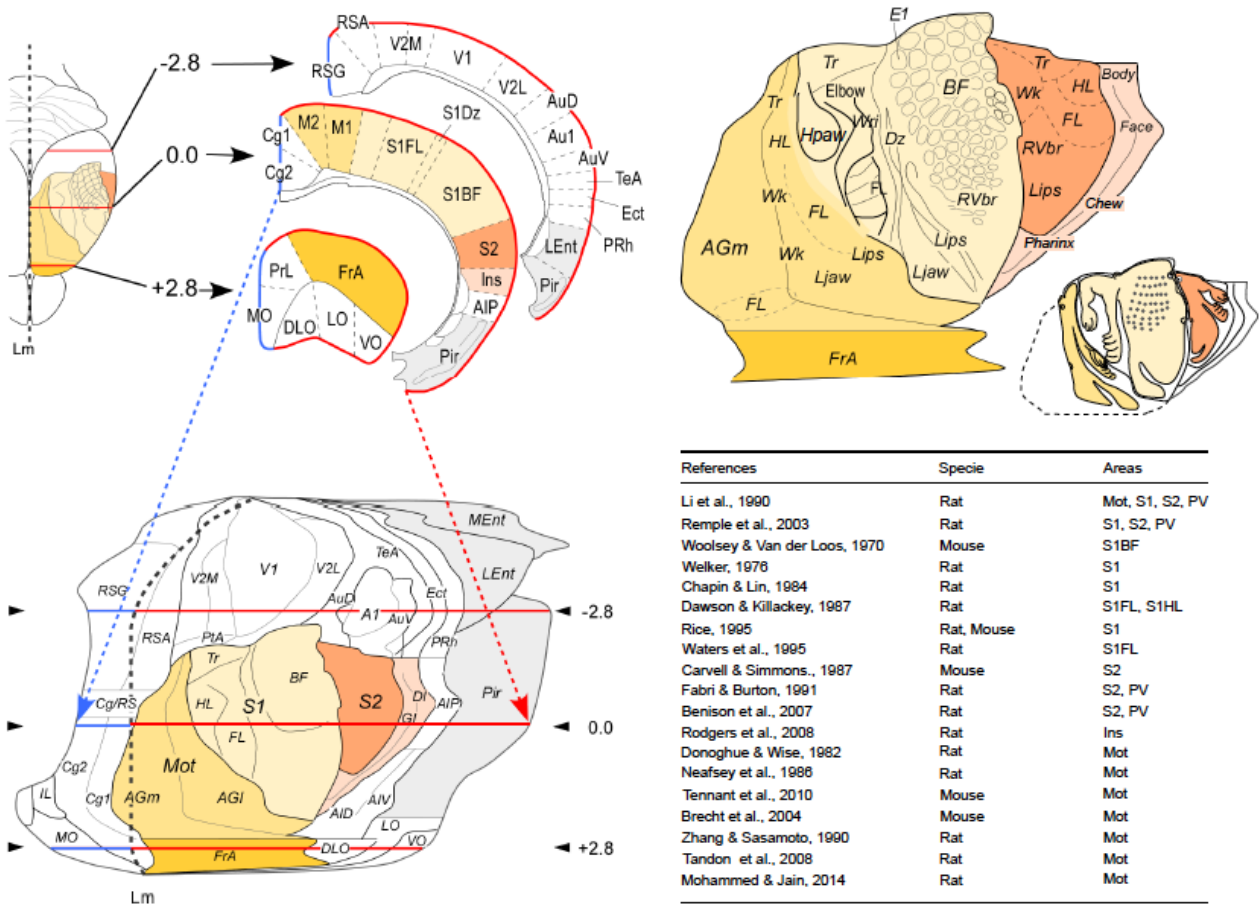
5.3. Experimentos de trazado de neuronas únicas

Debido a que el vector Sindbis causa muerte neuronal después de 72 horas de haber sido transfectado (Kim y cols., 2004), el tiempo de supervivencia en estos experimentos se limitó a un periodo de 55-65 horas. Tal y como se ha constatado en trabajos previos, este tiempo es suficiente para asegurar un marcado neuronal completo (Furuta y cols., 2001). Después de la perfusión y postfijación, los cerebros fueron bloqueados, crioprottegidos y cortados a 50µm en micrótopo de congelación. En este caso se obtuvo una única serie con todo el tejido, poniendo especial cuidado en no perder ninguna sección y en mantener todos los cortes ordenados. Las secciones correspondientes a la zona de inyección fueron montadas en fresco con PB 0,1M y examinadas bajo el microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse 600; filtro BV2A) con objetivos de 4X y 10X. En los casos donde la transfección fue exitosa, podía observarse claramente la fluorescencia de la proteína GFP tanto en las dendritas como en los somas neuronales. Sin embargo, el marcado axonal no es directamente visible con microscopía de fluorescencia. Con el fin de visualizar y estabilizar el marcado a lo largo de todo el axón, se realizó una inmunohistoquímica contra la proteína eGFP. Para ello se incubaron todas las secciones en un anticuerpo policlonar anti-eGFP de conejo (1:500; EXBIO, Prague. Czech Republic) y, a continuación, en un suero biotinilado anti-conejo obtenido en cabra (1:100; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Los primeros casos fueron revelados empleando el protocolo de doble amplificación con ABC y tiramina biotinilada utilizado por Kuramoto y cols. (2009). Debido a que con este protocolo de revelado se perdían detalles finos de la morfología axonal, como las varicosidades pequeñas o de tamaño medio, en la mayoría de los casos se utilizó el protocolo de incubación con ABC-BAB-Niquel y glucosa oxidasa que hemos descrito para el dextrano. Una vez concluido el revelado, todas las secciones fueron montadas, contrateñidas con tiónina, deshidratadas aclaradas y cubiertas.

6. MÉTODOS DE ANÁLISIS DEL MARCADO DE CONEXIONES

6.1. Generación de un mapa plano de referencia de la corteza del ratón

Para mapear las proyecciones talamocorticales del Po necesitábamos identificar, representar y comparar de una manera precisa y sistemática la localización anatómo-funcional del marcado axónico o de los depósitos corticales producido en cada uno de nuestro experimentos. Aprovechando la mínima variabilidad fenotípica de la cepa de ratón C57BL/6 y la existencia de un atlas estereotáxico sumamente preciso de su cerebro (Paxinos y Watson, 2001), nos planteamos crear un mapa bidimensional estandarizado de referencia basado en la estereotaxia de la superficie cortical. Para llevarlo a cabo medimos, en primer lugar, los perímetros corticales y los límites entre las diferentes áreas de cada una de las secciones coronales del atlas de Paxinos, y los representamos sobre sucesivas líneas verticales (1 corte cada 125µm) alineadas respecto a una línea horizontal que representaba el límite entre las superficies medial y dorsolateral del hemisferio cerebral (Rubio Garrido y cols., 2009). Las áreas somestésicas y motoras, de especial interés en nuestro estudio, se representaron con mayor detalle, complementando los datos de Paxinos con los obtenidos en diversos



estudios anatómicos y funcionales que se han publicado hasta la fecha.

6.2. Análisis de los experimentos de trazado anterógrado

6.2.1. Análisis de la distribución tangencial y laminar de los axones marcados

Las secciones coronales correspondientes a los experimentos de trazado anterógrado fueron examinadas con microscopía de campo claro (Nikon Eclipse 600). En primer lugar se determinó la posición del depósito de trazador en el núcleo, para lo cual se localizó la sección correspondiente al centro de la inyección (fácilmente indentificable debido a la pequeña lesión dejada por la pipeta en su descenso), se fotografió a 40 aumentos y se dibujó con el programa Canvas (versión X, ACD Systems). Las contrainyecciones de tiónina y de citocromo oxidasa permitieron la delimitación de los núcleos talámicos de interés, así como de los principales tractos. Con estas referencias se pudo determinar con precisión la posición relativa del depósito en el núcleo de acuerdo a las coordenadas del atlas Franklin y Paxinos (2001). En algunos casos representativos se estimó el tamaño del depósito (midiendo su diámetro mayor) y se determinó el número de neuronas que se habían marcado de forma efectiva hasta la corteza. Para ello se contó, utilizando todas las secciones, el número de axones que cruzaban el límite entre el estriado y la sustancia blanca cortical, y se descontó el número de neuronas que se habían marcado retrógradamente.

A continuación se mapeó la distribución areal y laminar de las arborizaciones axonales en la corteza cerebral utilizando una de las dos series de tejido. Primero se examinaron con cuidado todas las secciones bajo microscopía óptica de campo claro y/o de campo oscuro, para ubicar el marcado axonal. Después se representó bajo la cámara clara la localización, la extensión y la profusión de las arborizaciones axonales en el arco cortical sobre los niveles coronales correspondiente del atlas de Paxinos. Por último, se trasladó la representación sobre los cortes coronales del marcado axonal al mapa plano de referencia. Para controlar posibles sesgos, 5 de los casos fueron analizados y representados de forma independiente por 3 personas, no observándose diferencias relevantes en el resultado final. La representación de la arborización subcortical se realizó directamente sobre las secciones coronales del atlas.

En algunos casos representativos (ver resultados) se dibujaron a la cámara clara (objetivo de 20X) todos los axones marcados en varios niveles rostrocaudales representativos. Posteriormente, estas secciones coronales fueron representadas junto a los correspondientes límites citoarquitectónicos utilizando el programa Canvas.

6.2.2. Análisis de las varicosidades axónicas

En el presente estudio se comparó el tamaño de las varicosidades axónicas en dos de las principales áreas corticales inervadas por el Po: el área somatosensorial primaria de barriles y la corteza motora de vibrisas. El análisis se realizó en las láminas más densamente inervadas de cada área: la capa 5a en la corteza somatosensorial y la 4-3b en la motora. Para ello se seleccionaron 3 animales distintos que presentasen un marcado axonal de calidad y sin artefactos en ambas áreas. En cada una de las áreas de cada animal se midieron un total de 500 varicosidades, seleccionadas en varios campos aleatorios de muestreo obtenidos en diferentes secciones de la serie contrateñida con tionina. Las varicosidades se identificaron como engrosamientos cuyo diámetro fuese, como mínimo, dos veces mayor que el calibre del fragmento axónico que las contenía. Cada varicosidad fue enfocada con el objetivo de 100X, y el contorno de su proyección máxima fue dibujado a la cámara clara. Estos dibujos fueron luego digitalizados, redibujados y medidos con el programa Canvas. La comparación de tamaños entre las diferentes muestras se realizó con el estadístico de Kolmogorov-Smirnov.

6.3. Análisis de los experimentos de trazado retrógrado

En los experimentos de trazado retrógrado se determinó, en primer lugar, la localización del depósito en la corteza, así como su extensión areal y laminar. Para ello se examinaron las secciones bajo microscopía de epifluorescencia a 4x y con el filtro adecuado. Aquellos cortes en los que se visualizó el depósito fueron fotografiados, y con las referencias citoarquitectónicas proporcionadas por la sección adyacente (donde se reveló la actividad citocromo oxidasa) se localizó el depósito sobre las secciones coronales del atlas de Paxinos. Por último, la localización y extensión del depósito se representaron en el mapa plano.

Una vez ubicado el depósito cortical localizamos en el tálamo los somas neuronales marcados retrógradamente. Para ello, fotografiamos todos los niveles talámicos con una cámara digital (DXM1200, Nikon) acoplada a un microscopio de epifluorescencia (Nikon eclipse E600). Con el fin de disponer de una panorámica completa de cada nivel

talámico a gran resolución se realizó un mosaico de imágenes. Estas se obtuvieron con un objetivo Nikon plan fluor 10x de alta apertura numérica, especial para la detección de fluorescencia de baja intensidad, utilizando una platina motorizada acoplada al microscopio y controlada por el el módulo MIA del programa Analysis. Sobre una ampliación de estas imágenes panorámicas se señalaron, con el programa Canvas X (ACD Systems), todos los somas neuronales que aparecían marcados en en los núcleos Po y VPM de cada nivel talámico y, superponiendo las secciones adyacentes de citocromo oxidasa, se delinearon los contornos de los principales núcleos y haces de fibras de acuerdo a Paxinos. Para comparar la localización en el Po de las neuronas marcadas en experimentos distintos, se superpusieron los dibujos analizados de secciones equivalentes, teniendo en cuenta varias referencias citoarquitectónicas cláramente identificables como el límite entre el Po y el VPM, el límite entre el Po y los núcleos intralaminares, o la posición del haz mamilotalámico. A continuación se trazaron uno límites de compromiso entre el Po y los núcleos adyacentes.

En los experimentos de doble y triple trazado retrógrado se siguió este mismo proceso obteniéndose esta vez varias panorámicas de cada nivel talámico con varios filtros, según la combinación de trazadores empleados. Las imágenes obtenidas con los diferentes filtros fueron analizadas de forma independiente y luego superpuestas utilizando el programa photoshop (Adobe System). Con el fin de identificar neuronas doble o triplemente marcadas, aquellas zonas donde se entremezclaban los somas neuronales marcados con diferentes trazadores fueron examinadas con un microscopio confocal (Leica TCS-SPII) utilizando las líneas de laser argón 364nm y 488nm y..., y ajustando el espejo dicróico a 390-540nm y 514-527nm para asegurar una completa separación de canales. De las regiones de interés se obtuvieron pilas de imágenes de 1µm de grosor en el eje z con el objetivo de 63X. Estas imágenes fueron posteriormente analizadas con los programas Photoshop y Canvas, calculándose el porcentaje de neuronas marcadas con cada trazador y con cada combinación de trazadores.

6.4. Análisis de los experimentos de neuronas aisladas.

Las neuronas transfectadas con el vector Sinbis-pal eGFP fueron reconstruidas en su totalidad con la cámara clara. En primer lugar se localizó y dibujó el dominio somatodendrítico. A continuación se examinaron todas las secciones a bajo aumento (4x-10x) y se realizó un esbozo general del recorrido subcortical y cortical del axón, así

como de sus arborizaciones. Finalmente se dibujó con detalle (20-40x) todo el axón desde su origen en el soma hasta sus ramas más distales en la corteza cerebral. En los casos donde se reconstruyeron 2 neuronas transfectadas en un mismo hemisferio, todos los puntos de ramificación del axón fueron comprobados con el objetivo de 100x para evitar mezclar la reconstrucción de ambos axones. Los dibujos con las reconstrucciones completas de las neuronas transfectadas fueron digitalizados y redibujados en su totalidad con el programa Canvas. La delimitación de los núcleos talámicos, las áreas y capas corticales y los haces de fibras se pudo hacer de manera precisa gracias a la contratinción de tionina, según el atlas de Paxinos. Al igual que en los experimentos de trazado anterógrado poblacional, el marcado cortical fue representado sobre el mapa plano.

RESULTADOS

Hemos examinado la distribución cortical y subcortical de las proyecciones formadas por las neuronas talámicas multiespecíficas ubicadas en las diferentes regiones somatotópicas del Po del ratón. Para ello hemos realizado múltiples experimentos de trazado anterógrado de grandes y pequeñas poblaciones neuronales, experimentos de trazado de neuronas aisladas y experimentos de trazado retrógrado simple, doble y triple.

Empezaremos describiendo la distribución general de las proyecciones del Po, obtenida tras realizar depósitos grandes de BDA en distintas regiones del núcleo. A continuación analizaremos los patrones de arborización obtenidos mediante el trazado con BDA de pequeñas poblaciones neuronales en dominios muy restringidos del núcleo, y su correspondencia con los fenotipos axónicos de neuronas individuales transfectadas con el vector Sindbis –pal-eGFP en esos mismos dominios. Después describiremos los resultados obtenidos con algunos experimentos de colocación de trazadores retrógrados, que nos mostrarán la prevalencia en el núcleo de los fenotipos axónicos observados en los experimentos de trazado de neuronas aisladas. Por último, describiremos el mapa preciso de las proyecciones talamocorticales multiespecíficas del Po que hemos generamos mediante la aplicación de múltiples depósitos micropoblacionales de BDA en el núcleo y de trazadores retrógrados en la corteza cerebral.

1. EXPERIMENTOS DE TRAZADO ANTERÓGRADO POBLACIONAL

1.1. Experimentos de trazado con depósitos extensos de BDA

En los casos RA02, RA03 y RA04 se realizaron depósitos grandes de BDA en las regiones dorsolateral, ventral y medial del Po, respectivamente. Como control, se realizó también un depósito de tamaño similar en el VPM. En la Figura 1A se muestran las fotos de los depósitos y del marcado cortical en varios niveles representativos, mientras que en las figuras 1B y C se ha representado el marcado cortical obtenido en cada uno de los experimentos sobre el mapa plano de las áreas somestésicas y motoras de la corteza (ver materiales y métodos).

Cada uno de los depósitos realizados en el Po produjo un marcado extenso que abarcaba varias áreas somestésicas y motoras en regiones distintas de la corteza.

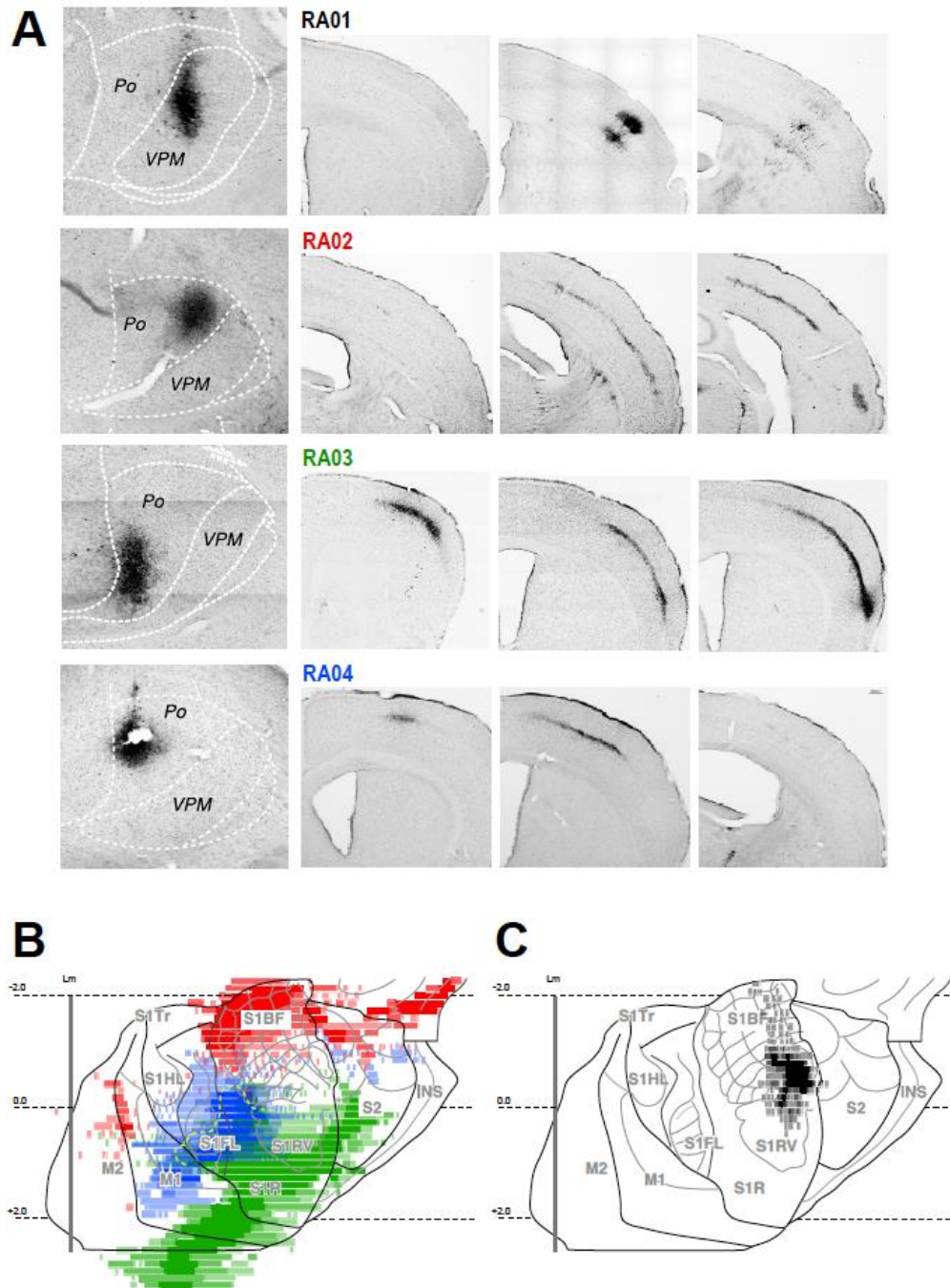


FIGURA 1. Experimentos de trazado anterógrado poblacional mediante depósitos grandes de BDA. A: Localización de los depósitos en los núcleos VPM (RA01) y Po (RA02-04) y de los axones marcados en tres niveles rostrocaudales distintos de la corteza. **B-C:** Representación sobre el mapa plano de las cortezas somatosensoriales y motoras del ratón del marcado cortical completo obtenido en cada experimento. En B se han representado sobre el mismo mapa los tres experimentos de Po. Los valores a la izquierda de los mapas indican la distancia respecto a Bregma. Lm=línea media.

En el caso RA02 (depósito dorsolateral) se marcaron regiones caudales de S1BF, S1DZ, S2 y la zona más rostral de la corteza ectorrinal. En M1 se obtuvo un parche aislado que ocupaba una pequeña franja caudal en el límite con M2. También se observaron axones marcados en la corteza asociativa parietal (PtA) y en V2L. En el caso RA03 (depósito ventral) se marcaron las regiones más rostrales de S1, M1, M2, S2, INS y una zona central extensa de FrA. Por último, en el caso RA04 (depósito medial) se marcaron principalmente una región lateral de S1, que correspondía a la representación de las extremidades, y regiones mediales de M1. También se observó marcado axónico, aunque más disperso, en S1BF y S2. La zona amarilla en la Figura 1B corresponde a un solapamiento de las arborizaciones axónicas en los casos RA02 y RA03. En claro contraste con estos patrones de proyección, desde el depósito de VP (RA01) se marcó una región mucho menos extensa, que se restringía a la representación de vibrisas de (Fig 1F).

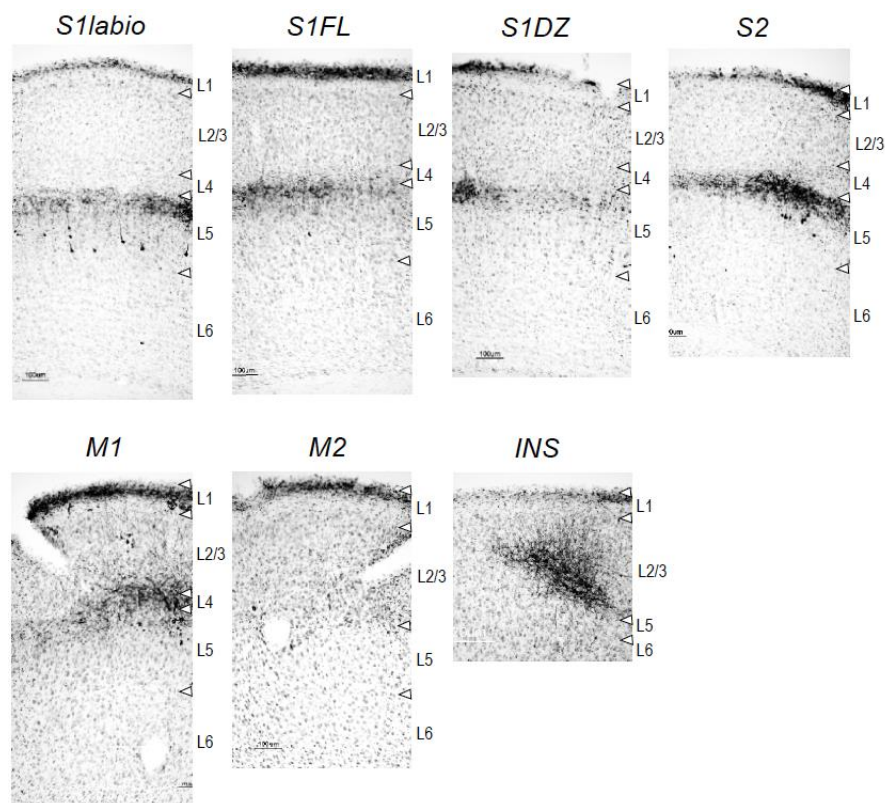


FIGURA 2. Distribución laminar de los axones marcados con depósitos grandes de BDA en diferentes áreas corticales. En las imágenes se puede observar cómo los axones del Po se distribuyen preferentemente en las capas 1 y 5a de la representación del labio en S1, de la representación de la extremidad anterior en S1 (S1FL) y de la region disgranular (S1DZ). Por el contrario, se distribuyen de forma preferente en las capas 5a, 4, 3 y 1 de las cortezas somatosensorial secundaria (S2), motora primaria (M1), motora secundaria (M2) e insular (INS) Al tejido se le realizó una contratinción de tionina.

En cuanto a la distribución laminar del marcado (Figuras 1A y 2), se observó que los axones arborizaban en la capa 1a de todas las áreas corticales inervadas. Esta inervación en capa 1 parecía ser especialmente profusa en algunas áreas, como S1FL y muy escasa en las cortezas insulares y ectorrinales. Además, los axones arborizaban de forma profusa en la capa 5a de las cortezas somestésica y motoras, y en la capa 3-4 de las cortezas motora primaria, somatosensorial secundaria, insular y ectorrinal. En la corteza motora secundaria los axones arborizaban, casi exclusivamente, en la capa 1.

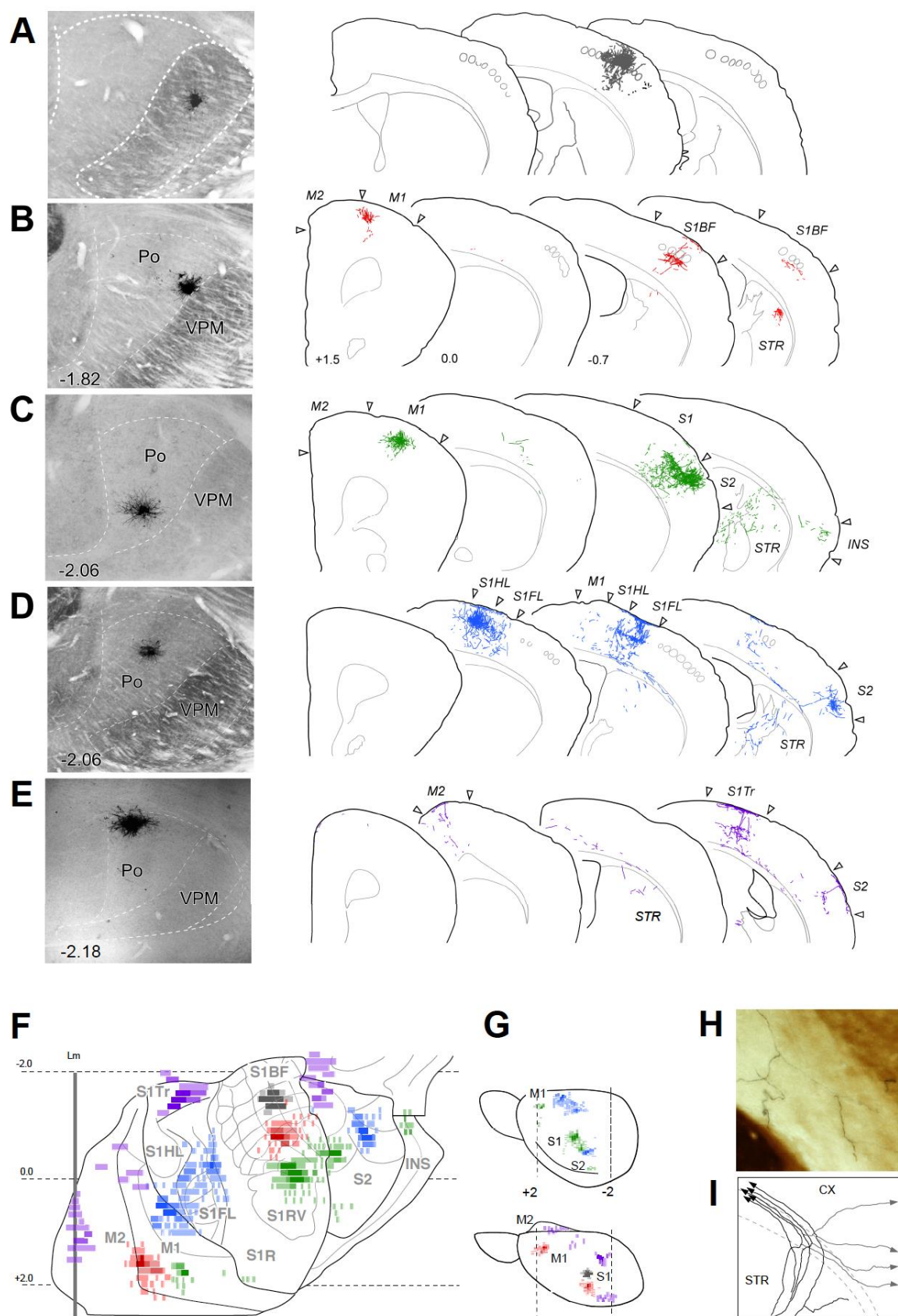
Por último, en algunos casos también se marcaron algunas estructuras subcorticales. Así, desde los depósitos dorsolateral y ventral se marcaron tanto el estriado dorsolateral como el núcleo lateral de la amígdala. En cambio, desde el depósito situado medialmente solo se marcó, y de forma muy escasa, alguna región rostral del estriado.

1.2. Experimentos de trazado con microdepósitos de BDA

En los casos RA05-8 realizamos depósitos de BDA mucho más restringidos, con el fin de estudiar de forma precisa los patrones de arborización de pequeñas poblaciones neuronales localizadas en distintas representaciones somatotópicas del núcleo. Así, utilizando una combinación de parámetros adecuada (ver materiales y métodos) se realizaron 4 depósitos esferoideos pequeños (120µm, 20-50 neuronas bien trazadas hasta la corteza) localizados en las regiones lateral (RA05), ventral (RA06), media (RA07) y dorsomedial (RA08) del núcleo. Estas regiones se corresponderían, de manera aproximada, con las representaciones de vibrisas, cara, extremidad posterior y tronco, del mapa somatotópico de la rata definido por Diamond (1992).

En la Figura 3 se muestran los depósitos de BDA y los dibujos de los axones marcados (ver materiales y métodos) en 4 niveles corticales representativos para cada uno de los casos. Al igual que en la Fig 1E, en la figura 2E se ha representado el marcado cortical obtenido en los 4 casos sobre un mismo mapa plano.

FIGURA 3. Experimentos con depósitos micropoblacionales de BDA. A: Ubicación de un depósito en el VPM y reconstrucción con cámara clara de los axones marcados en la corteza en tres niveles representativos. **B-E:** Ubicación de cuatro depósitos en diferentes regiones del Po y reconstrucción con la cámara clara de los axones marcados en varios niveles representativos. **F:** Representación sobre el mapa plano de la corteza del ratón del marcado cortical completo obtenido en los cinco experimentos. **G:** Ramificación de dos axones del Po en la sustancia blanca. Contraintinción de citocromo oxidasa. **H:** reconstrucción con cámara clara de cinco axones del Po a su paso por la sustancia blanca. Se puede observar cómo 4 de ellos ramifican para dirigirse a dos regiones distintas de la corteza.



Los depósitos pequeños de BDA revelaron, en esta ocasión, un patrón de innervación cortical discontinuo en cada uno de los casos, de forma que los axones arborizaban focalmente en 2-4 áreas somatosensoriales y motoras. En cada caso, las representaciones somatotópicas innervadas en las diferentes áreas eran generalmente las mismas, y diferían a su vez de acuerdo a la ubicación del depósito.

Los axones marcados desde el depósito lateral (caso RA04) arborizaron focalmente en una zona rostral de S1BF, que abarcaba una extensión aproximada de 3 barriles, y en una zona rostral de la representación de vibrisas de M1 que tenía una extensión similar.

Los axones marcados desde el depósito más ventral (caso RA05) innervaron focalmente 4 áreas corticales distintas: una región posterior y lateral de la representación de las vibrisas rostrales en S1, los dominios correspondientes en las áreas motora primaria y somatosensorial secundaria, y una pequeña región caudal en la corteza insular, que podría corresponder a la representación de la cara. Desde el depósito situado más lateramente, ubicado en una región central del núcleo, se obtuvo marcado axonal en las representaciones de la extremidad anterior de S1, S2 y M1. Por último, desde el depósito dorsomedial se marcaron la representación del tronco en S1, la zonal más caudal y medial de S2, próxima a la representación del tronco en esta área, y una región medial de M2.

En cuanto al patrón laminar, en las áreas S1BF, S1rvibr, y S1Tr los axones arborizaban, fundamentalmente, en las capas 5a y 1. En S1HL, M1, S2 y Ect. las capas más densamente innervadas fueron la 4, la 3a y, en menor medida, la 5a. Salvo en S1HL, la innervación de la capa 1 en estas áreas resultó ser muy excasa o inexistente. Por último, la capa más innervada en M2 fue la 1.

En todos los casos, a excepción del que tenía el depósito más medial, se marcó también el estriado. Al igual que ocurría en la corteza cerebral, la localización y extensión de las arborizaciones axónicas variaban en función a la ubicación del depósito. Así, los axones procedentes de la región ventral del núcleo arborizaron en regiones ventrales del estriado. Los que procedían del depósito más lateral arborizaban, muy focalmente, en el estriado dorsolateral. Por último, los axones trazados desde el depósito dorsomedial innervaban, también focalmente, regiones más mediales. En el caso que tenía el depósito

más ventral (RA06) también se observaron axones marcados en el núcleo lateral de la amígdala

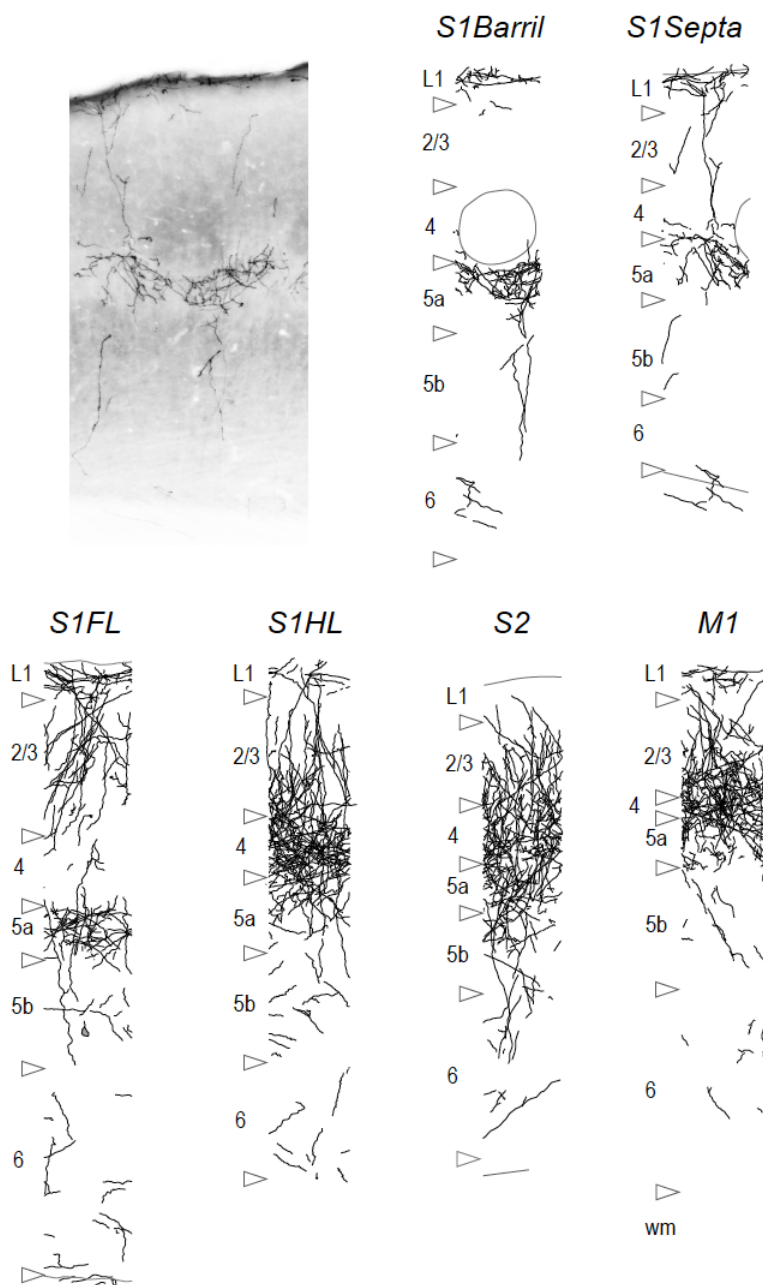


FIGURA 4. Distribución laminar de los axones marcados con depósitos pequeños de BDA en diferentes áreas corticales.

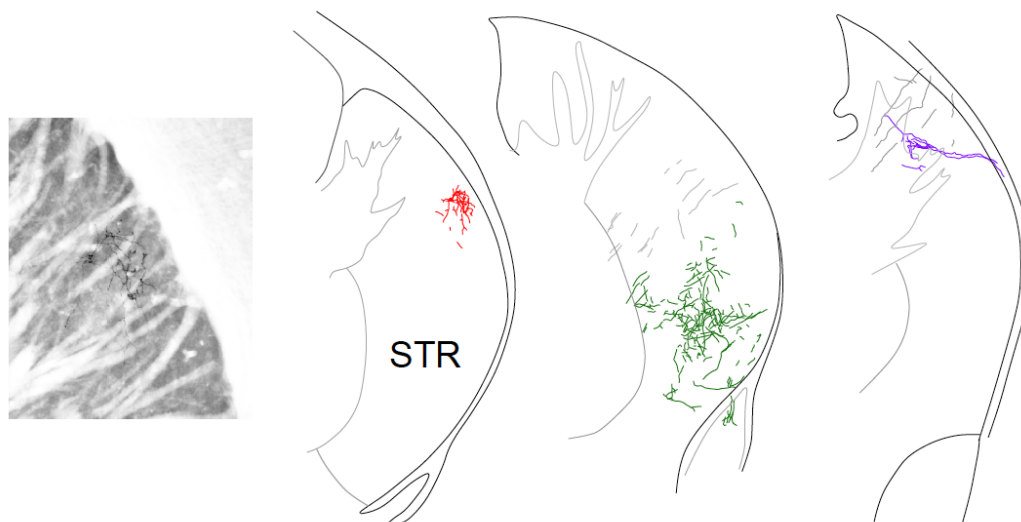


FIGURA 5. Arborización en el estriado de los axones del Po marcados mediante pequeños depósitos de BDA en diferentes regiones del núcleo. Se muestra la reconstrucción a la cámara clara de un nivel representativo de los casos B, C y E que ilustramos en la FIGURA 3.

2. EXPERIMENTOS DE TRAZADO DE NEURONAS AISLADAS

Para comprobar la correspondencia entre los patrones de innervación producidos por pequeñas poblaciones neuronales y los fenotipos axónicos concretos de neuronas multiespecíficas, realizamos experimentos de trazado de neuronas aisladas con el vector viral Sindbis-pal-eGFP. Tal y como se ha mostrado en trabajos previos, este vector es capaz de producir un marcado axonal completo de las NTPs multiespecíficas en un corto espacio de tiempo. Sin embargo, la transfección neuronal mediante la inyección de las partículas virales carecía, incluso en encéfalos grandes como el de la rata, de la precisión espacial que se requería en nuestro estudio. Para solventar este problema desarrollamos un nuevo método que nos permitió transfectar neuronas con el vector RNA libre en localizaciones definidas del núcleo de una forma sencilla y eficaz (Porrero y cols., 2016; ver descripción detallada en Materiales y Método....). Con este método transfectamos un total de 8 neuronas en aquellas regiones del Po que previamente habíamos estudiado mediante depósitos de BDA. El examen microscópico reveló que todas ellas exhibían arquitecturas axónicas multiespecíficas. De las 8 neuronas transfectadas realizamos una reconstrucción axonal detallada y completa en 6 de ellas. En todos los casos el marcado era óptimo y continuo en toda la extensión del axón.

En las figuras.....se ilustra la ubicación del soma y las dendritas en el Po y la reconstrucción axonal completa, realizada con cámara clara a partir de todas las secciones coronales que la contenían (ver materiales y métodos), de las 6 neuronas.

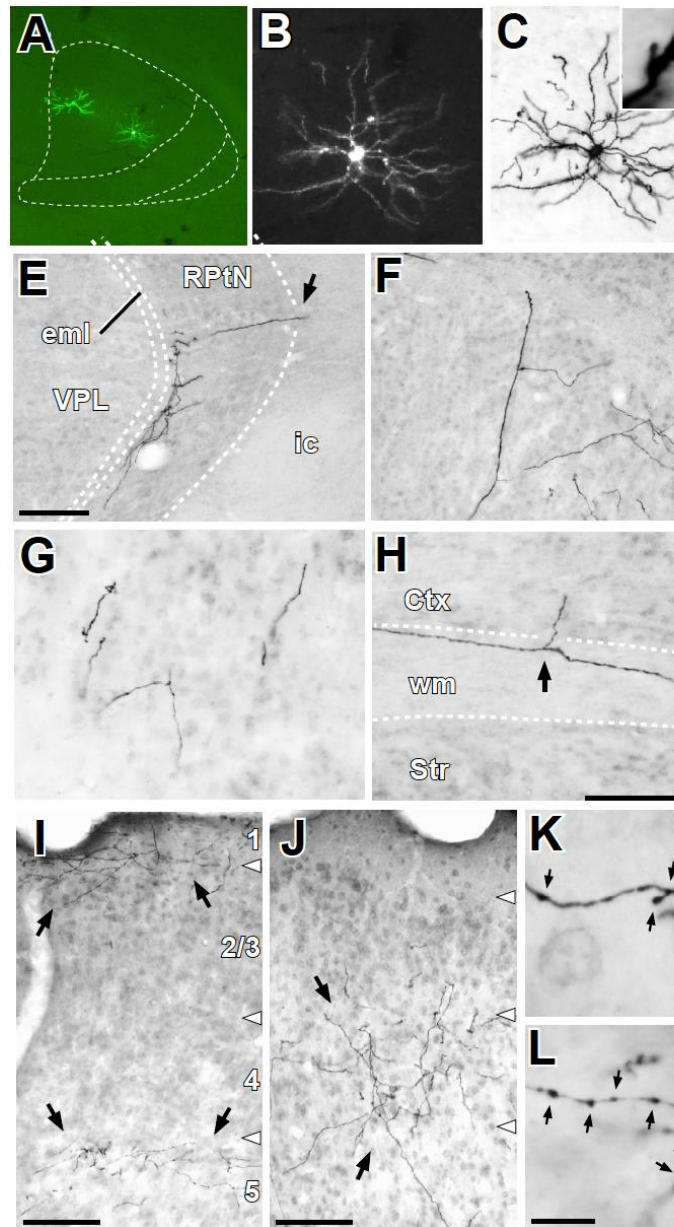
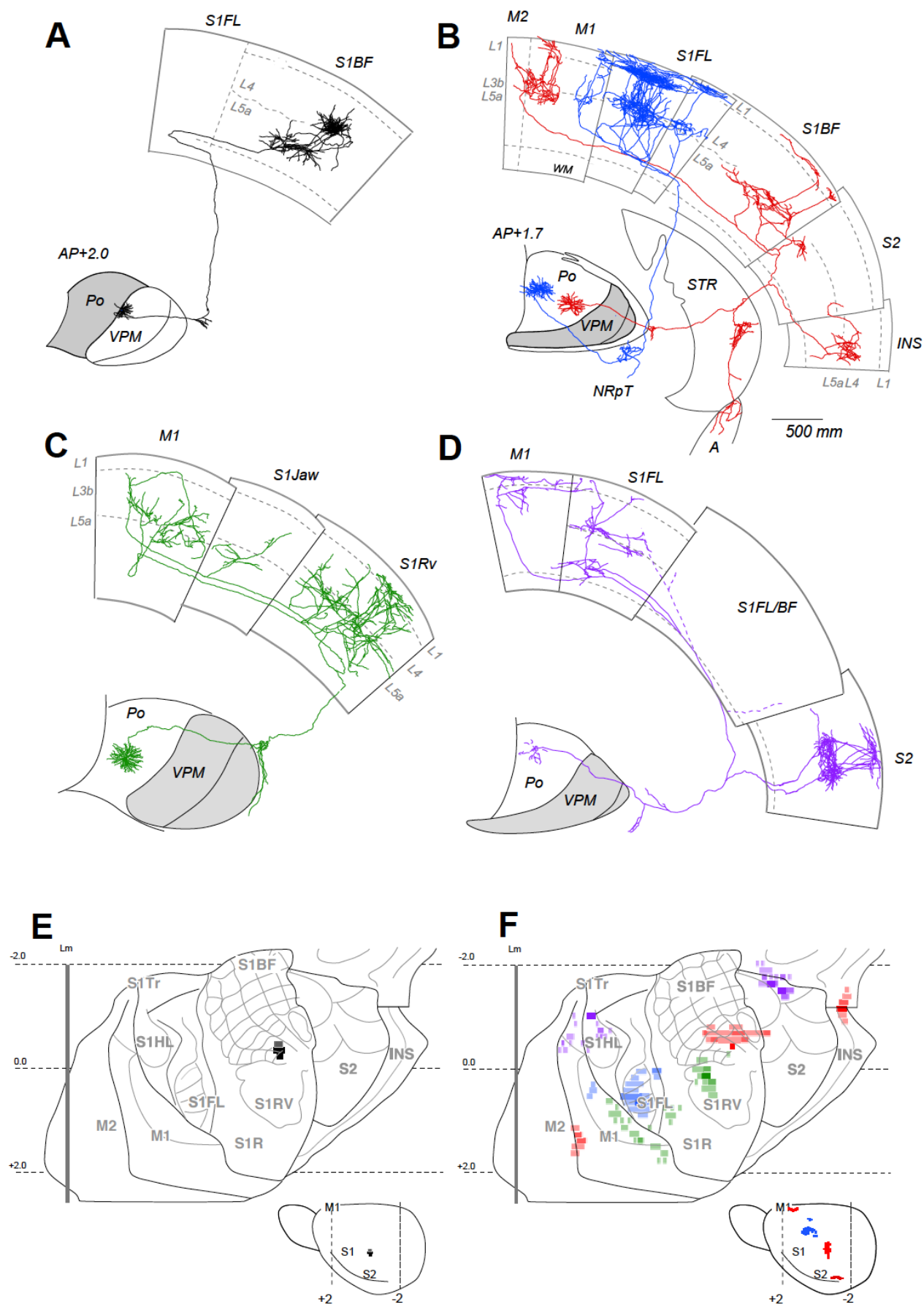


FIGURA 6. Morfología somatodendrítica y recorrido del axón de una neurona del Po transfectada con el RNA del vector Sindbis-Pal-GFP. A: Imagen obtenida con el microscopio de epifluorescencia de dos neuronas del Po transfectadas en un mismo experimento. **B:** Imagen ampliada de la neurona ubicada lateralmente. **C:** Aspecto de la misma neurona después de ser revelada. **d:** Detalle de las espinas dendríticas. **E:** Arborización del axón a su paso por el NRpT. **F:** Arborización de la neurona en el estriado. **G:** Arborización en el núcleo lateral de la amígdala. **H:** Colateral emitida por el axón a su paso por la sustancia blanca cortical. **I:** Arborización terminal del axón en S1. **J:** Arborización terminal del axón en la corteza insular. **K-L:** Detalle de la arborización axonal en ambas áreas donde se pueden observar numerosas varicosidades.



2.1. Experimento con dos neuronas localizadas en las regiones lateral y medial del núcleo

Las neuronas n1 y n2 (Fig....) fueron obtenidas un mismo experimento de transfección y se localizaban, respectivamente, en las regiones lateral y medial de un mismo nivel talámico. La neurona 1, ubicada más lateralmente, inervaba focalmente varios dominios corticales y subcorticales. Después de inervar el NRpT, su axón atravesaba el estriado emitiendo una rama colateral que arborizaba en la región dorsolateral y acabada dando algunas ramas terminales en el núcleo lateral de la amígdala. El axón principal entraba en la sustancia blanca cortical a la altura de S2 y se dividía en 2 ramas. Una de ellas se dirigía lateral y caudalmente para acabar arborizando en la capa 4 de corteza insular. La otra rama discurría medial y rostralmente por la capa 6b, arborizando en las capas 5a y, en menor medida, la capa 1 de la región rostrolateral de la corteza de barriles, en la capa 5a de una pequeña región de S2 y, por último, en las capas 5a, 4, 3ª y 1 de la zona rostral de la corteza motora primaria de vibrisas.

El axón de la neurona 2, de ubicación medial, atravesaba el estriado sin arborizar en él. Una vez en la corteza, emitía numerosas colaterales en la capa 6b para inervar las capas 5a, 4, 3b y 1 de la región de S1 correspondiente a los dígitos de la extremidad anterior, Finalmente y mediante unas pocas ramas, acababa arborizando las capas 5a y 1 de la representación de la extremidad anterior en M1.

2.2. Experimento con una neurona localizada en la región ventral

El axón de la neurona localizada en la región ventral del núcleo (n3) (Fig ...) también atravesaba el estriado sin inervarlo. Una vez en la sustancia blanca cortical el axón se dividía en dos ramas que acababan arborizando en las capas 5a y 1 de la representación de las vibrisas rostrales en S1, y en las capas 5a y 4 de zonas rostrolaterales de la corteza motora primaria, que podrían corresponderse a la representación de los labios.

FIGURA 7. Distribución cortical y subcortical de los axones de varias neuronas transfectadas con el RNA del vector Sindbis-Pal-GFP. Se muestra la reconstrucción con cámara clara de los dominios somatodendríticos y del axón completo de cada una de las neuronas. **A:** Neurona transfectada en el núcleo VPM. **B:** Reconstrucción de 2 neuronas del Po transfectadas en la región lateral (roja) y medial (azul) en el mismo experimento. **C:** Reconstrucción de una neurona transfectada en la región ventral del Po. **D:** Reconstrucción de una neurona transfectada en la región dorsomedial del Po. Las líneas discontinuas hacen referencia a ramas axonales que cambian de plano y no llegan a arborizar. **E:** Representación sobre el mapa plano de la corteza del ratón de la arborización axonal obtenida en A. **F:** Representación sobre el mapa plano de la corteza del ratón de las arborizaciones axonales de las 4 neuronas transfectadas en el Po.

2.3. Experimento con una neurona localizada dorsomedialmente

La neurona más dorsal emitía un axón que, antes de entrar en la corteza cerebral, se dividía en dos ramas. La más lateral arborizaba de forma profusa y focal en las capas 5a y 1 de la representación del tronco en S2. La rama más medial recorría una gran extensión de la sustancia blanca y de la capa 6b para acabar arborizando en las capas 4 y 6 de S1HL y en las capas 1 y 2 de M1. Debido a la pérdida de dos secciones de tejido, la arborización en estas dos últimas regiones podría ser más profusa de lo que aparece ilustrado. Por último, se observaron otras dos ramas colaterales que se originaban en el axón principal: una de ellas ascendía hasta la capa 5 de S1BF, mientras que la otra avanzaba en dirección caudal hacia la corteza visual primaria. Aunque el trazado era bueno y permitía seguir ambas ramas a lo largo de todo su recorrido, estas no llegaron a arborizar en ningún momento.

2.4. Experimento con 2 neuronas localizadas en 2 niveles distintos, rostral y caudal, de la región lateral del núcleo

En otro de los experimentos conseguimos transfectar y reconstruir dos neuronas situadas en la misma posición dorsoventral y mediolateral (...), pero en niveles rostrocaudales distintos (...). Tras inervar el NRpT, ambas neuronas arborizaban en el estriado. La neurona más rostral lo hacía de forma más profusa y en una posición algo más medial que la neurona caudal. Una vez en la corteza, los axones de ambas neuronas arborizaban siguiendo un mismo arco rostrocaudal, pero a diferentes niveles en el eje mediolateral. La neurona más rostral inervaba las capas 5a y 1 de una región rostromedial de la corteza de barriles y las capas 4 y 1 de la región de macrovibrissas vibrissas de S2. La neurona más caudal arboriza de forma muy profusa en las capas 4, 3 y 1 de la corteza insular y, con menor profusión, en las capas 5, 4 y 1 de S2. En S1BF solo se observaron 2 pequeñas colaterales axónicas. Es importante señalar, no obstante, que debido al solapamiento de las arborizaciones axonales de ambas neuronas en algunas regiones de S1 y S2, algunas de las ramas terminales atribuidas a la neurona.... podrían pertenecer a la neurona....

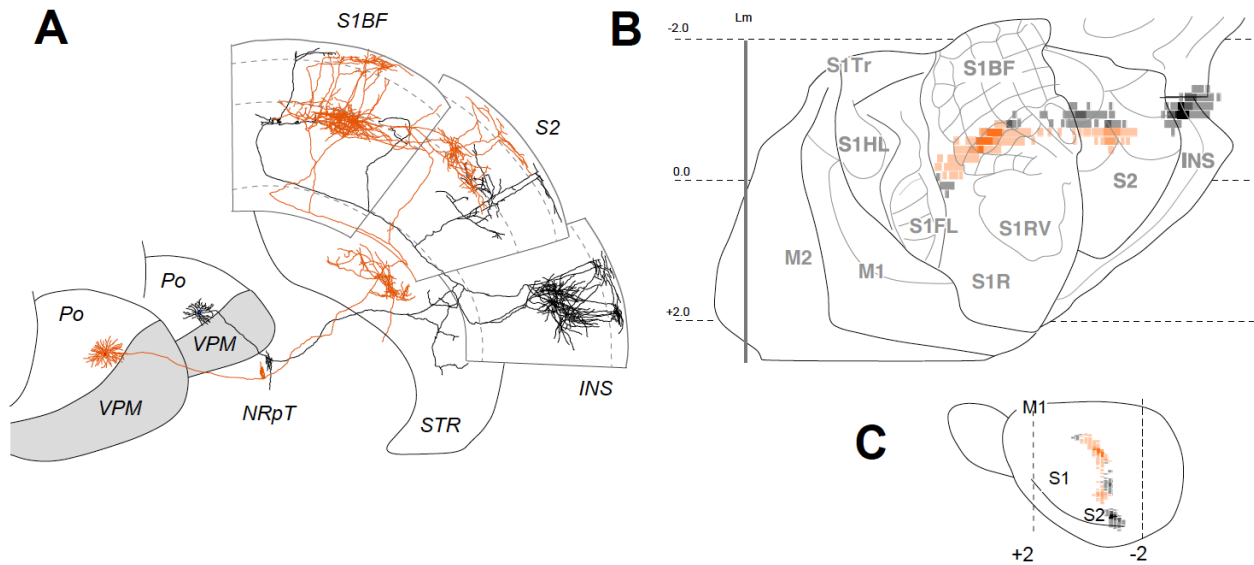


FIGURA 10. Experimentos de mapeo del Po mediante la realización de depósitos micropoblacionales de BDA en diferentes regiones del núcleo. A: Fotografías donde se muestran los depósitos de algunos de los experimentos. Contratinción de tiónina. **B:** Localización en el Po de todos los depósitos utilizados en el estudio. La localización se representa según el atlas de Paxinos.

3. EXPERIMENTOS DE COLOCALIZACIÓN DE TRAZADORES RETRÓGRADOS

En base a los patrones de inervación cortical observados con los experimentos de trazado poblacional y de neuronas aisladas nos propusimos explorar, a nivel poblacional, la abundancia en el Po de neuronas que proyectasen mediante colaterales axónicas a dominios alejados de las cortezas motora primaria, somestésica primaria y somestésica secundaria. Para ello realizamos 3 experimentos de colocación triple con los trazadores FB (azul), CTB-A594 (rojo) y CTB-A488 (verde) Estos trazadores fueron aplicados en las áreas M1, S1, y S2 según la trayectoria caudo-rostral que parecían seguir los axones del Po en la corteza

De los tres experimentos realizados, uno fue desechado al detectarse contaminación en S1 desde los depósitos ubicados en M1 y de S2. En el segundo caso no se observó transporte desde el depósito de S2, aunque sí desde los depósitos de M1 y S1. Tal y como se ilustra en la figura.... el depósito localizado en M1 quedó ubicado en una

región lateral de dicha área, mientras que el de S1 se extendía en la región rostral de la corteza de barriles, en la zona disgranular y en una pequeña región de S1FL. En la figura... se muestra el análisis del marcado neuronal en tres niveles representativos del núcleo. Utilizando el microscopio de epifluorescencia y el microscopio confocal, se pudieron observar un gran número de neuronas marcadas en toda la extensión rostrocaudal del núcleo. Estas neuronas se ubicaban en la mitad dorsal del núcleo y ocupaban regiones mediales y laterales. Se detectaron diferencias en cuanto a la ubicación de las neuronas marcadas desde S1, más ventrales, y M1, más dorsales, en las regiones laterales del núcleo (Figura...). También se podía apreciar una zona de solapamiento (amarilla) que sugería la presencia de numerosas neuronas doblemente marcadas. Aunque sólo un 11% de las neuronas marcadas en el núcleo habían captado los dos trazadores, en la zona de solapamiento este porcentaje de neuronas doblemente marcadas se elevaba a un 40%.

En el tercer experimento se consiguieron realizar 3 depósitos restringidos (FIG....) y se observó transporte desde cada uno de ellos. El primer depósito, de CTB-A594, se localizó en regiones rostrales de la corteza motora de vibrisas. El segundo depósito, de CTB-A488 se localizó en S1 y abarcaba zonas correspondientes a la corteza de barriles, a la representación de las vibrisas rostrales, a la zona disgranular y a regiones mediales de S1FL. Por último, el tercer depósito (FB) fue ubicado en una pequeña zona de S2 donde confluían las representaciones de las vibrisas, del tronco y de las extremidades.

Tras examinar y fotografiar todas las secciones bajo microscopía de epifluorescencia, tres niveles rostrocaudales representativos del Po (1 de cada 6; rostral, medio y caudal) fueron analizados con microscopía confocal, determinándose el porcentaje de neuronas marcadas con uno o varios de los trazadores. De las 583 neuronas marcadas, se observó colocalización en un 33,1% de ellas. De éstas, el 86% captaron 2 de los trazadores, y el 13% restante captaron los 3. En el nivel más rostral solo se marcaron neuronas desde M1 y S1, con un 27% de neuronas doblemente marcadas. En el nivel intermedio, la mayoría de las neuronas también se marcaron desde M1 y S1, y sólo unas pocas desde S2. Se observó colocalización de trazadores en el 16% de las neuronas. De estas, el 83% estaban doblemente marcadas y el 17% habían captado los 3 trazadores. En el nivel más caudal predominaron las neuronas marcadas desde S2, mientras que las proyectantes a M1 eran minoritarias. El 31,9% de las neuronas en este nivel se habían marcado con más de un trazador. De estas, el 76% habían captado dos de los trazadores, y el 24% los 3.

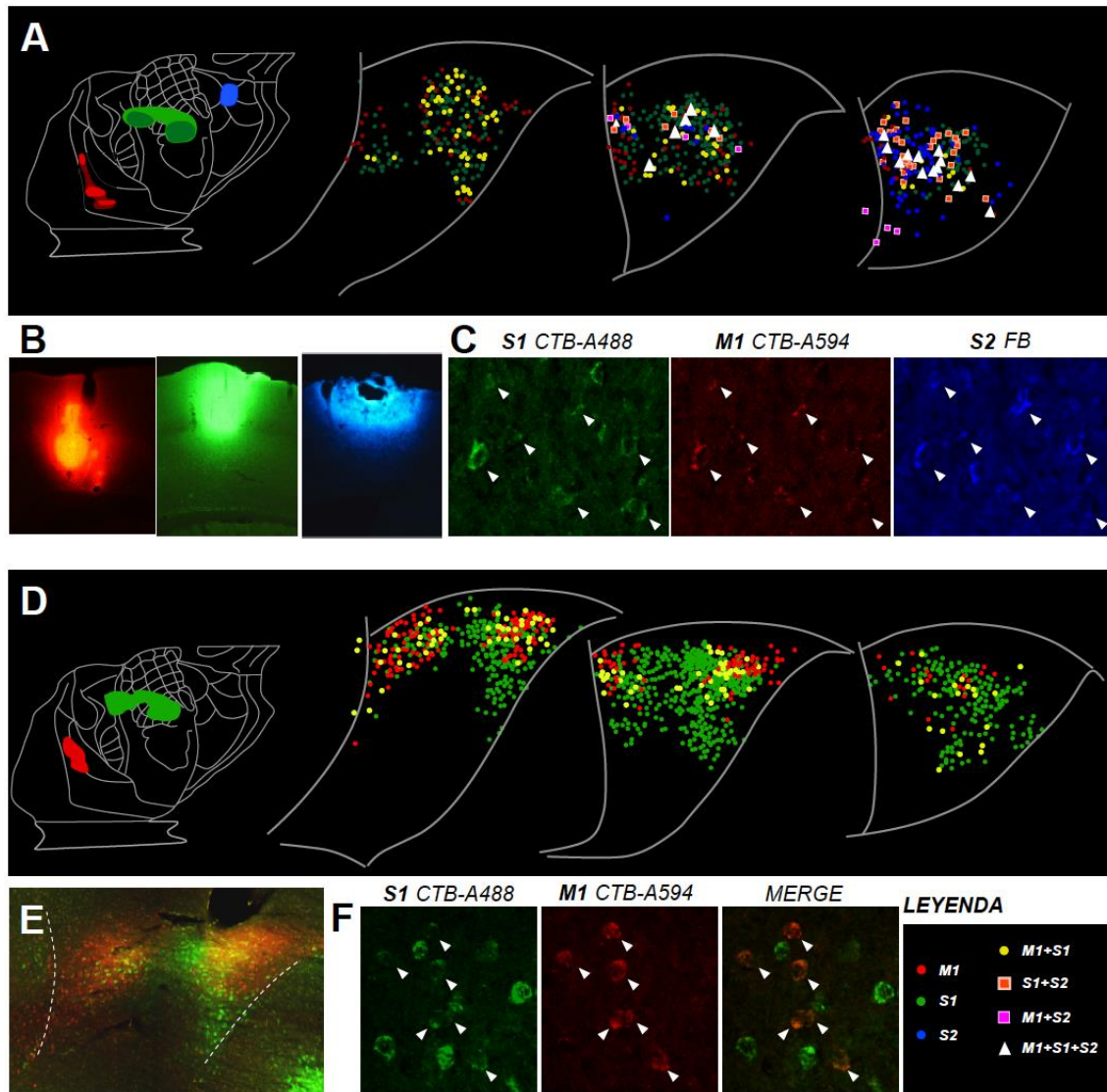


FIGURA 9. Colocalización en el tálamo de trazadores retrógrados aplicados diferentes áreas de la corteza cerebral. **A:** Experimento con tres trazadores. A la derecha se representa sobre el mapa plano de la corteza la ubicación de tres depósitos aplicados en diferentes áreas corticales en un mismo experimento. El primero, de CTB-A488 se localizó en M1, el segundo, de CTB-A594 en S1, y el tercero, de FB en S2. A la derecha se muestra la localización de las neuronas marcadas con uno, dos o los tres trazadores en 3 niveles representativos del Po. El código utilizado se explica en la esquina inferior derecha **B:** Fotografías de los 3 depósitos. **C:** Fotografías realizadas con el microscopio confocal donde se puede observar la colocalización de los tres trazadores en varias neuronas. **D:** Experimento con 2 trazadores. A la derecha se representa sobre el mapa plano de la corteza la ubicación de dos depósitos aplicados en diferentes áreas corticales en un mismo experimento. El primero, de CTB-A488 se localizó en M1, el segundo, de CTB-A594 en S1. A la derecha se muestra la localización de las neuronas marcadas con uno o con los dos trazadores en 3 niveles representativos del Po. **D:** Superposición de dos imágenes de la misma zona del Po realizada con dos filtros distintos en el microscopio de epifluorescencia. El color amarillo indica un solapamiento de los dos trazadores. **E:** Fotografías realizadas con el microscopio confocal donde se puede observar la colocalización de los dos trazadores en varias neuronas.

4. MAPEO DE LAS PROYECCIONES CORTICALES Y SUBCORTICALES DE LAS NEURONAS DEL PO

Para determinar con precisión cuál es el mapa de las proyecciones multiespecíficas del Po, analizamos la distribución cortical y subcortical de los axones marcados en 52 depósitos micropoblacionales de BDA ubicados en distintas regiones del núcleo. Después, analizamos la distribución en el tálamo de las neuronas marcadas desde 30 depósitos corticales de FB y FG localizados en diferentes dominios de las áreas somestésicas y motoras.

4.1. Mapeo de las proyecciones corticales del Po mediante el análisis de múltiples depósitos micropoblacionales de BDA realizados en diferentes regiones del núcleo

Se realizaron un total de 65 depósitos micropoblacionales de BDA en el tálamo. 53 de ellos se ubicaron en el Po y otros 12 en núcleos adyacentes, como el VPM, el VL, el LP, el núcleo angular, el CL y el Pf. Estos últimos fueron controles útiles para determinar la correcta localización de los depósitos de Po más limítrofes. De los 53 casos donde los depósitos se localizaban dentro de los límites del Po, 18 fueron descartados, y los 35 restantes fueron cuidadosamente analizados para este estudio. En la figura (...) se ilustran 16 de estos depósitos y en la Figura (...) se indica la localización de todos los depósitos utilizados en el estudio de acuerdo al mapa estereotáxico de Paxinos. Los depósitos localizados en regiones dorsolaterales se han representado en rojo, los ubicados en regiones ventrales en verde, y los mediales en azul. El depósito situado en la esquina dorsomedial del núcleo se ha representado en violeta. En casi todos los casos, los depósitos quedaron restringidos en 2 secciones adyacentes (120µm) con lo que podían ser referidos a un único nivel rostrocaudal. La reconstrucción sobre el mapa plano del marcado cortical completo obtenido en cada uno de estos depósitos se ilustra en la fig..... Para visualizar con mayor facilidad posibles heterogeneidades en el eje rostrocaudal, los mapas se han ordenado en función de la ubicación rostrocaudal de los depósitos.

A continuación resumiremos los resultados obtenidos agrupando los depósitos por regiones.

4.1.1. Depósitos localizados en regiones laterodorsales del Po

Los axones trazados desde los depósitos situados en la región laterodorsal del núcleo (coordenadas laterales a $1.25\ \mu\text{m}$ en el eje mediolateral y dorsales a $3.35\ \mu\text{m}$ en el eje dorsoventral) inervaban, generalmente, entre 2 y 4 áreas corticales distintas. En todos los casos se encontraron proyecciones a la corteza de barriles (S1BF). Las otras áreas inervadas podían ser las representaciones de las macrovibrisas de S2 y M1, la zona disgranular de S1, y las zonas más caudales de la corteza insular. Desde los depósitos más laterales se marcaron zonas también más laterales de S1BF, mientras que desde los depósitos mediales se obtuvo marcado axónico en los barriles más mediales y/ en la zona disgranular de S1. En el resto de las áreas inervadas no se detectaron diferencias respecto a la localización de los axones en función de la posición mediolateral del depósito. Por otra parte, la ubicación del depósito en el eje dorsoventral determinaba una distinta localización caudo-rostral del marcado axonal en la corteza. Aunque esta topografía se observaba fundamentalmente en S1BF, también se daba en M1 y S2

También se observaron diferencias en cuanto a los patrones de inervación en función de la ubicación rostrocaudal del depósito. De forma que desde los depósitos más rostrales predominaron las proyecciones a la corteza motora. Por el contrario, desde los más caudales se obtuvo mucho marcaje en las cortezas somatosensorial secundaria, insular y ectorrinal, y un marcaje escaso o inexistente en M1. Por otra parte, también se apreció un gradiente rostrocaudal en cuanto a la representación en el núcleo de la dimensión mediolateral de la corteza de barriles, de forma que los barriles más mediales tenían una representación mayor en los niveles más rostrales del núcleo, mientras que los más laterales estaban más representados en los niveles caudales.

4.1.2. Depósitos localizados en regiones ventrales del Po

La región ventral del núcleo (coordenadas.....) proyectaba a las regiones más rostrales de la corteza, que incluían la región lateral de la corteza frontal asociativa, la representación de las vibrisas rostrales y la cara de S1BF, M1, S2 y regiones correspondientes a la faringe y a la boca de la corteza insular. Desde los depósitos situados más dorsalmente, en el centro de esta región ventral del núcleo se obtuvo marcado en la región de las vibrisas rostrales de S1 de forma que la dimensión mediolateral en la corteza estaba representada en la dimensión dorsoventral del núcleo. Desde los depósitos más ventrales se marcaron las regiones más rostrales de S1,

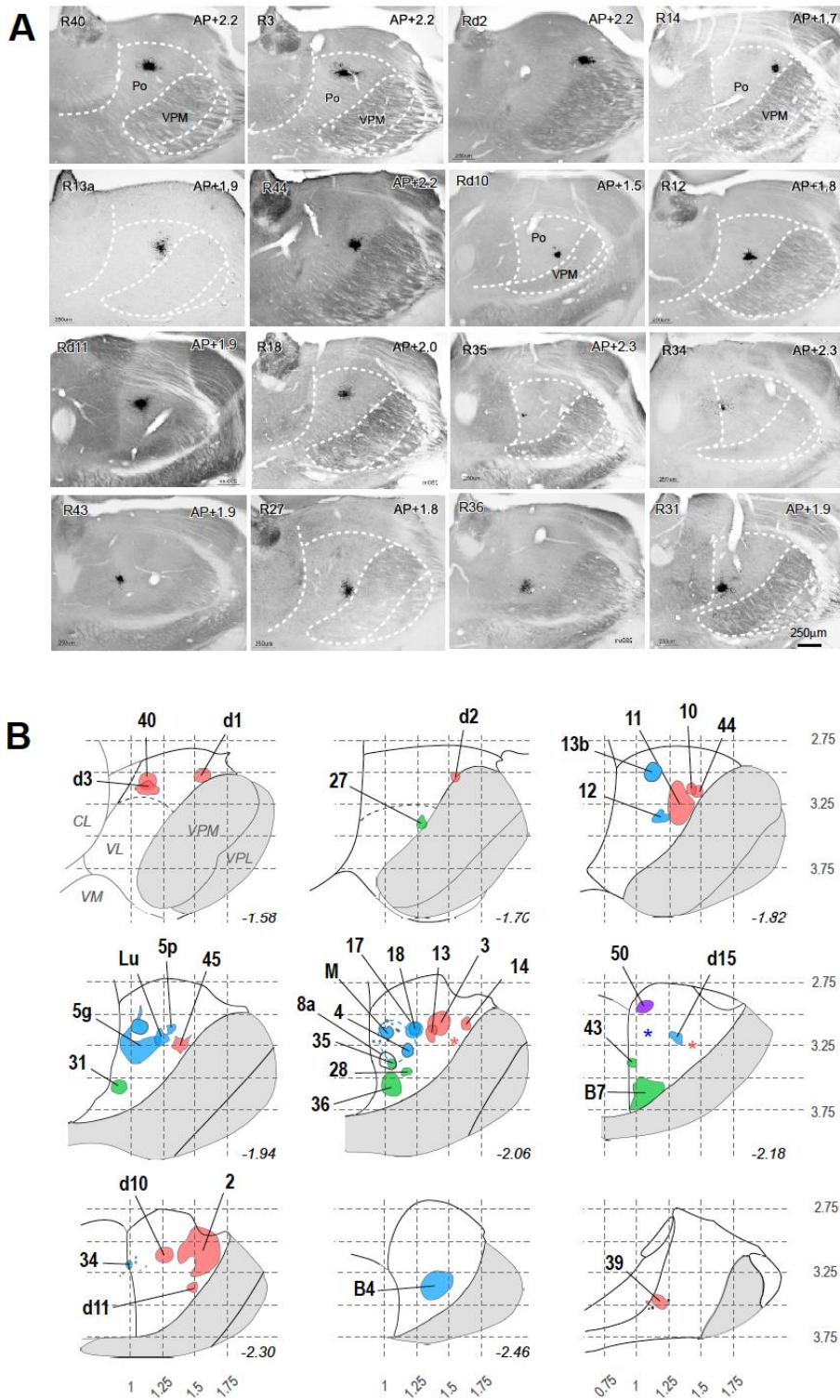


FIGURA 10. Experimentos de mapeo del Po mediante la realización de depósitos micropoblacionales de BDA en diferentes regiones del núcleo. A: Fotografías donde se muestran los depósitos de algunos de los experimentos. Contratinción de tionina. **B:** Localización en el Po de todos los depósitos utilizados en el estudio. La localización se representa según el atlas de Paxinos.

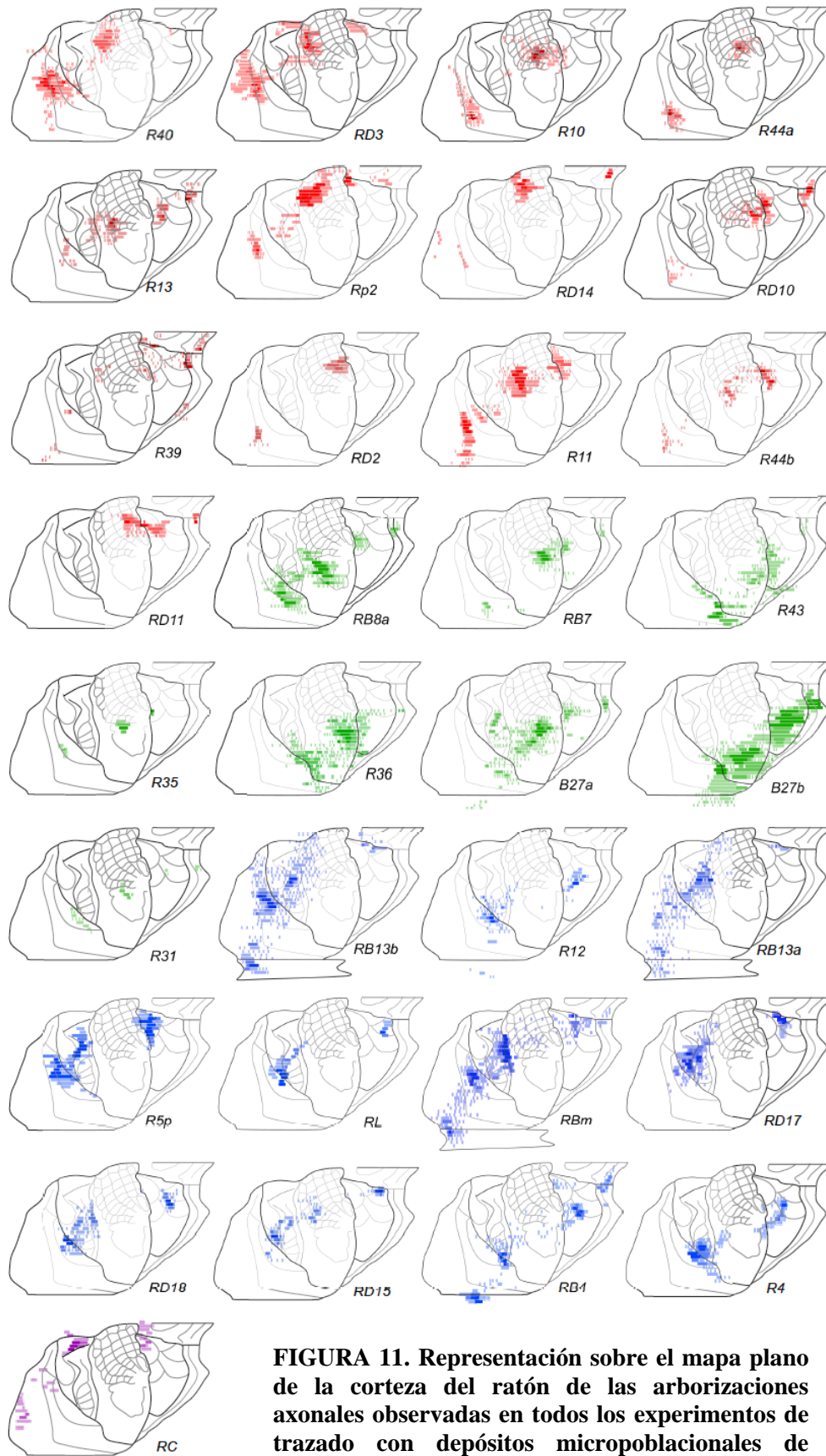


FIGURA 11. Representación sobre el mapa plano de la corteza del ratón de las arborizaciones axonales observadas en todos los experimentos de trazado con depósitos micropoblacionales de BDA.

correspondientes a representaciones como la de los labios o la mandíbula. Dentro de M1, las proyecciones se organizaban de forma que los depósitos más ventrales producían marcado en regiones también más rostrales de la corteza motora. En el resto de áreas no se detectó una topografía clara.

En este caso, no se apreciaron diferencias claras en cuanto a los patrones de inervación cortical según la ubicación rostrocaudal del depósito. Independientemente de ésta, y a diferencia del caso anterior, casi siempre se obtuvo marcado axónico en las áreas motoras S1, S2 y corteza insular.

4.1.3. Depósitos localizados en regiones mediales del Po

Los depósitos situados en las regiones mediales del núcleo produjeron marcaje en las representaciones espinales, correspondientes a las extremidades y al tronco, de las cortezas motora, S1, S2, en zonas mediales de la corteza frontal de asociación y en la región más caudal de la corteza insular. Desde esta región del núcleo se observaron dos focos de marcado axonal en la corteza motora: uno en la región de FL de M1, y el otro en una segunda representación de FL en M2. La representación somatotópica de las regiones espinales en el núcleo estaba invertida en el eje mediolateral respecto a los casos anteriores. De tal forma que las regiones más laterales proyectaban a HL y a las zonas más mediales de la representación de FL en S1, mientras que los depósitos más mediales marcaron las regiones más laterales de S1FL. Por otra parte, desde los depósitos más ventrales se marcaron regiones rostrales de S1FL. En el resto de áreas corticales no se apreciaron diferencias significativas en la localización del marcado axónico en función de la localización del depósito en el núcleo, salvo un desplazamiento del marcado en el eje caudal-rostral en función de la localización dorsoventral del depósito.

4.2. Mapeo de las proyecciones estriatales del Po mediante el análisis de múltiples depósitos micropoblacionales de BDA realizados en diferentes regiones del núcleo

Desde los depósitos ubicados en regiones laterales y ventrales del núcleo se marcaron axones en diferentes regiones del estriado dorsolateral. Los axones procedentes de regiones laterales del núcleo arborizaban muy focalmente y de forma topográfica (ver figura) en regiones laterales y mediales del estriado, mientras que los axones procedentes de las regiones ventrales lo hacían de una manera algo más dispersa en regiones ventrales del estriado. Desde los depósitos ubicados en la región medial del núcleo, solo se observaron axones arborizando en zonas del estriado rostrales a Bregma de manera muy excepcional.

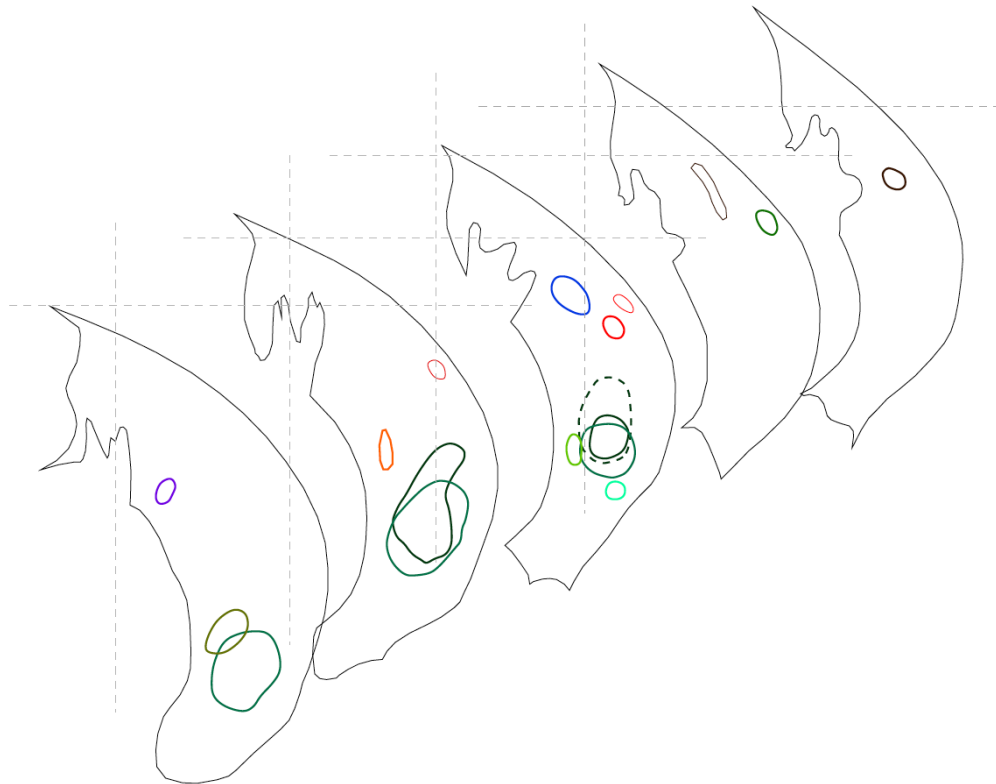


FIGURA 12: Distribución en el estriado de los axones marcados en los experimentos con microdepósitos de BDA que se ilustran en la figura 10. Se representa el marcaje en distintos niveles rostrocaudales del estriado

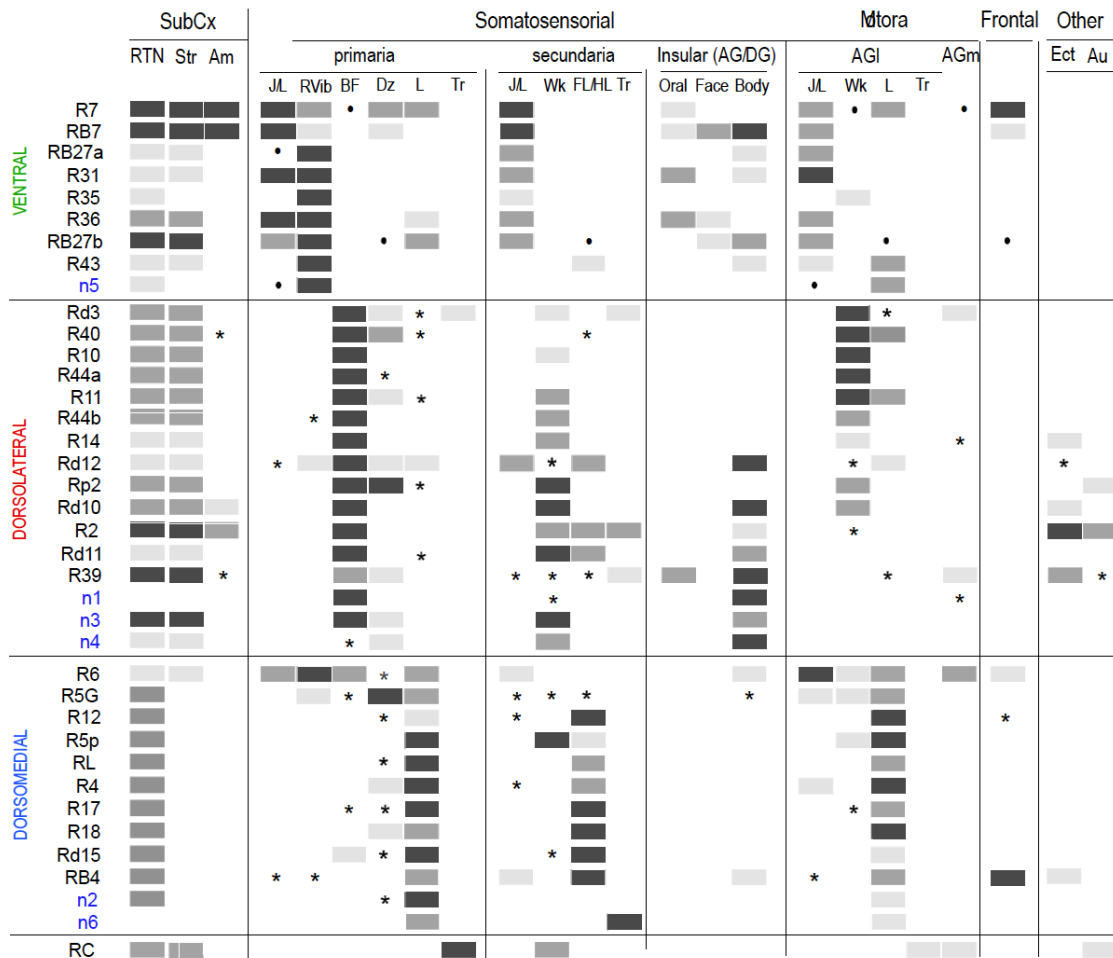


TABLA: Comparación a nivel cualitativo de la distribución cortical y subcortical de los axones marcados mediante depósitos micropoblacionales de BDA y mediante transfección con el RNA del vector Sindbis-PI-GFP de neuronas aisladas. La escala de de grises indica la densidad de innervación observada en cada caso. Los asteriscos indican el ocasional de axones.

4.3. Mapeo basado en múltiples depósitos corticales de trazadores retrógrados

Como complemento a los experimentos de trazado de pequeñas poblaciones neuronales, realizamos un total de 31 depósitos de FB y FG en diferentes representaciones de las áreas motoras y somestésicas de la corteza cerebral. En la figurase muestra la ubicación de los depósitos y la localización de las neuronas marcadas en varios niveles rostrocaudales representativos de 15 casos escogidos para el análisis. Con el fin de comparar la ubicación de las neuronas marcadas desde depósitos localizados en diferentes dominios de una misma área cortical (M1, S1 o S2/Ins.Ect), superpusimos el resultado del análisis obtenido en los distintos casos. En la figura..... mostramos la superposición de niveles talámicos equivalentes pertenecientes a casos distintos.

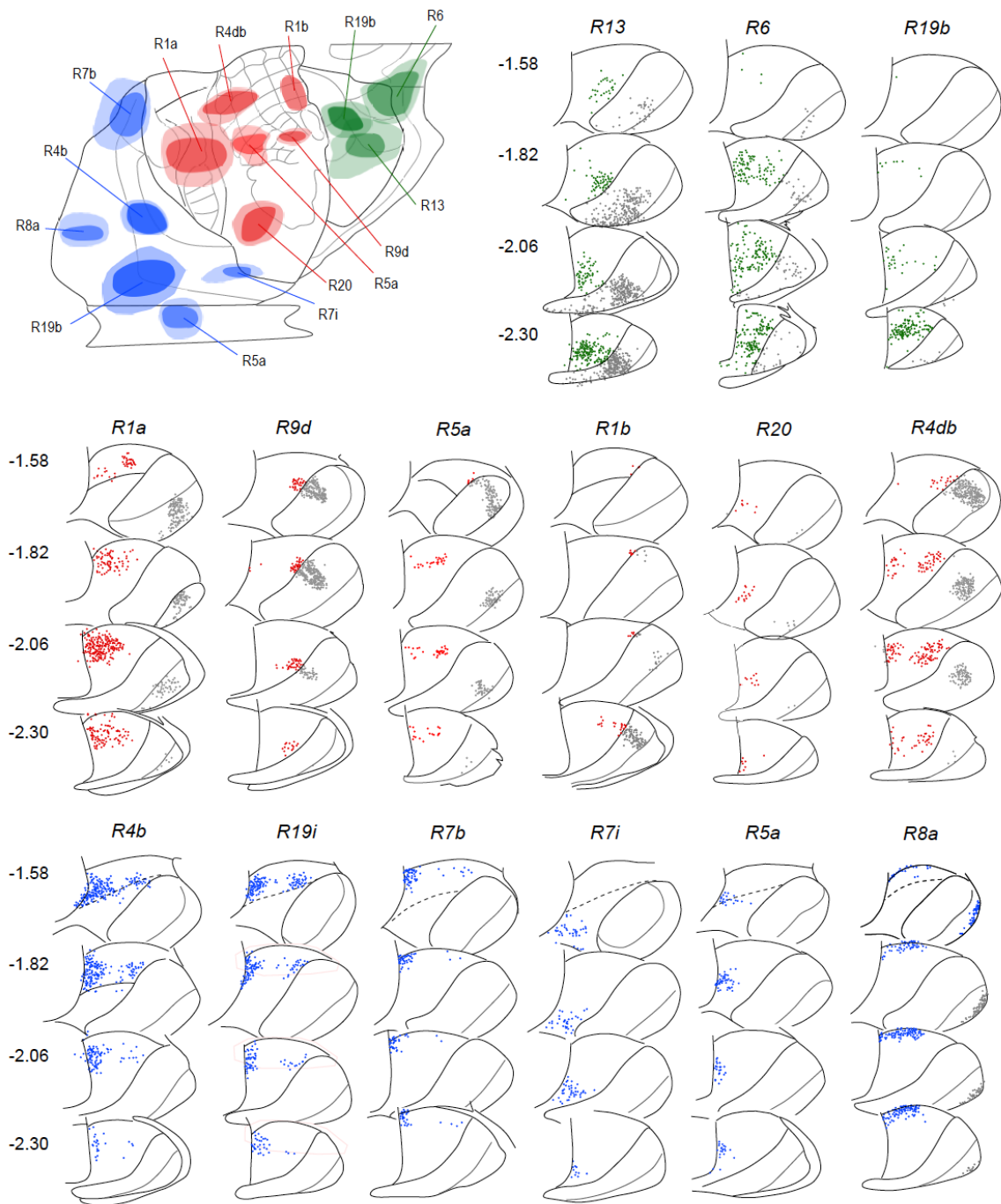


FIGURA 13: Resumen de los experimentos de trazado retrógrado simple. Se indica la posición de los depósitos en el mapa plano de la corteza y se representa el marcado neuronal obtenido en el Po en varios niveles representativos.

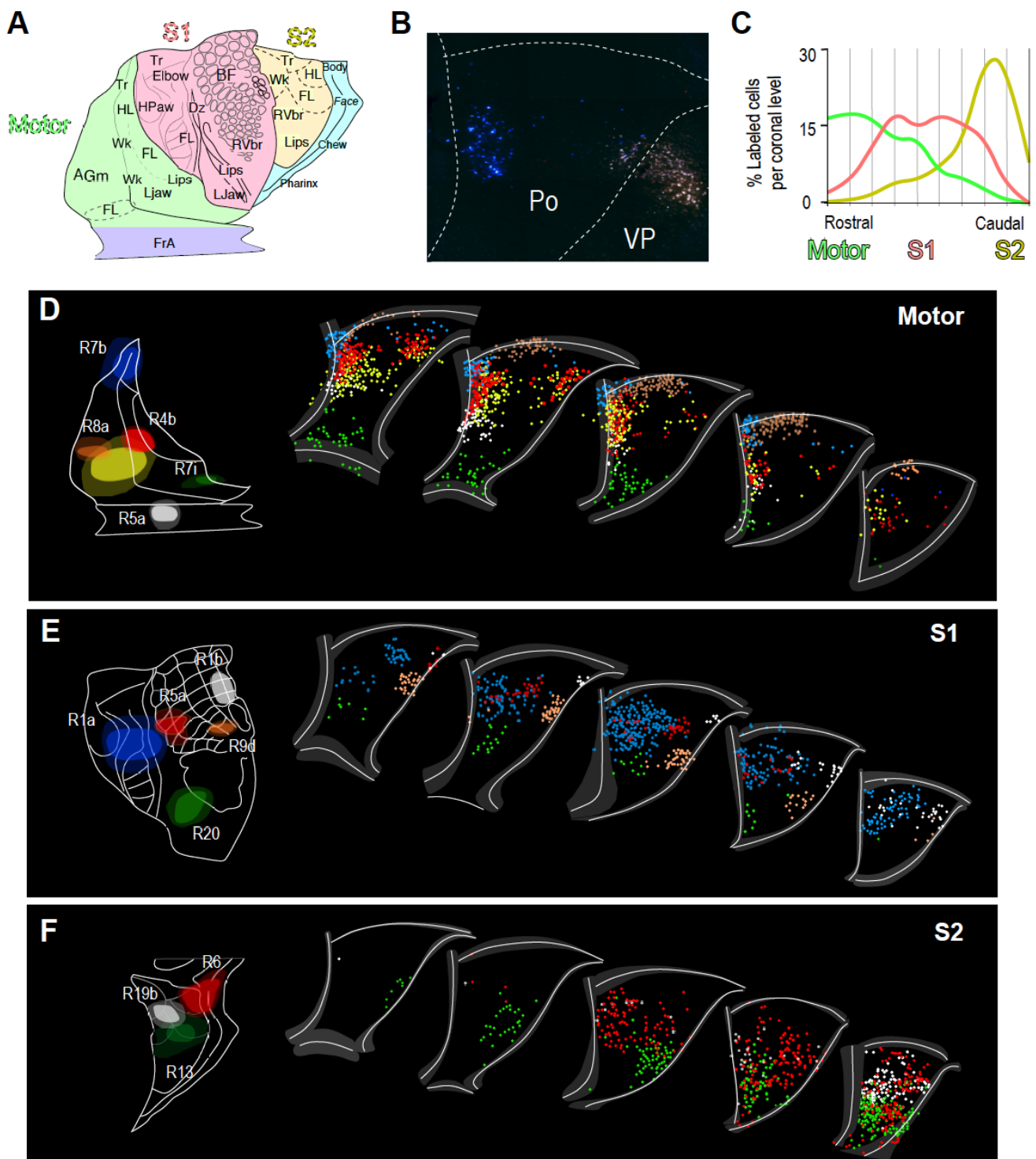


FIGURA 14: Superposición del marcado neuronal obtenido mediante depósitos corticales de trazadores retrógrados en diferentes experimentos. Se representa en cada caso el análisis de cinco niveles rostrocaudales distintos del Po.

Por regla general, los depósitos produjeron uno o varios focos de marcado neuronal en diferentes regiones del Po. En todos los casos analizados, las neuronas marcadas tenían la misma ubicación en los distintos niveles rostrocaudales, observándose tan solo un aumento o disminución gradual del número de neuronas marcadas. Este gradiente rostrocaudal resultó ser distinto en cada una de las áreas muestreadas. La figura 1 indica el porcentaje de neuronas marcadas desde cada área en cada uno de los niveles coronales analizados. El análisis refleja la media de 3 casos representativos en cada área. Se puede apreciar claramente cómo los depósitos ubicados en la corteza motora marcaron mas neuronas en los niveles rostrales del núcleo. Por el contrario, desde S2 se marcaron muchas más neuronas en los niveles más caudales. Los depósitos ubicados en S1 marcaron neuronas en, prácticamente, toda la extensión del núcleo, pero abundaban sobre todo en los niveles centrales.

4.3.1. Depósitos localizados en M1-FrA

Se realizaron 6 depósitos en diferentes regiones de M2, M1 y FrA que tal y como se ilustra en la figura... marcaron pequeñas poblaciones neuronales en diferentes regiones del núcleo. Así, Desde el depósito localizado más caudalmente en la corteza (caso R7b) se marcó una pequeña población de neuronas en la esquina dorsomedial de niveles anteriores y medios del núcleo, mientras que desde los depósitos R4b y 19b y R5a (en FrA), ubicados en regiones cada vez más rostrales de la corteza, se marcaron pequeñas poblaciones neuronales en ubicaciones cada vez más ventrales en el núcleo. Las diferentes poblaciones de neuronas marcadas estaban en parte solapadas, y este solapamiento parecía ser mayor los niveles más caudales. Desde los depósitos R7b, 19b y, sobre todo, desde el R4b, tambien se marcó un pequeño grupo de neuronas en la región laterodorsal. Desde el depósito más rostral de la corteza se marcaron neuronas de una forma algo dispersa en la región más ventral del núcleo. Por último, desde el depósito ubicado en la zona más medial de M2 se marcaron neuronas ubicadas en la franja más dorsal del Po.

4.3.2. Depósitos localizados en S1

De los 6 depósitos realizados en S1, cuyo análisis aparece detallado en la fig... Hemos representado la superposición del marcado neuronal en 5 de ellos. En general, observamos que las diferentes poblaciones de neuronas marcadas se distribuyen de

forma más equitativa en las diferentes regiones del núcleo, y a diferencia de los casos anteriores, estas poblaciones están mucho más segregadas. En este caso se aprecia una clara organización somatotópica de las neuronas en el núcleo. Concretamente, desde los tres depósitos ubicados en la corteza de barriles se han marcado tres pequeñas poblaciones de neuronas en la región lateral del Po, de forma que las neuronas más laterales se han marcado desde el depósito más lateral, y las más ventrales desde el más rostral. De igual modo, desde el depósito situado en la región más rostral de S1 se han marcado neuronas en la región ventral del núcleo. Por último, el depósito localizado en la región más medial de S1, correspondiente a la representación de las extremidades, ha marcado un gran número de neuronas en la región dorsomedial del núcleo.

4.3.3. Depósitos localizados en S2

Los 3 depósitos localizados en S2 produjeron abundante marcado neuronal en los niveles más caudales del núcleo. Aunque también aquí se aprecia cierta organización de las neuronas en el núcleo según la región de S2 de la que habían captado el trazador, el marcado es, en este caso, más disperso.

5. ANALISIS DE LAS VARICOSIDADES AXÓNICAS

La gran calidad del marcado anterógrado obtenido mediante la aplicación de microdepósitos de BDA permitía visualizar de forma clara las varicosidades axónicas en las zonas de arborización. Se seleccionaron 3 casos que presentaban un marcado axónico óptimo tanto en la corteza de barriles como en la representación de las vibrisas de la corteza motora, y se midieron un total de 500 varicosidades axónicas en cada área de cada caso. En concreto se midieron las varicosidades en la capa 5a de S1 y en la capa 3-4 de M1. A modo de control, también se midieron las varicosidades en la capa 4 de la corteza de barriles en 3 casos con depósito de BDA en el VPM (Figura...). El tamaño medio de las varicosidades de los axones del Po en M1 fue de $1,6 \pm 0,8 \mu\text{m}^2$, significativamente mayor al tamaño de las varicosidades en S1BF ($1,01 \pm 0,5 \mu\text{m}^2$; $p < 0,001$, U de Mann-Whitney y Kolmogorov-Smirnov), y también mayor que el tamaño de las varicosidades de los axones del VPM en S1BF ($1,3 \pm 0,6$; $p < 0,001$, U de Mann-Whitney y Kolmogorov-Smirnov). Por otra parte, la distribución de frecuencias del tamaño de las varicosidades en la neurona individual que proyectaba a S1 y M1, y

en la transflectaba en VPM coincidía con la distribución de frecuencias de los casos poblacionales .

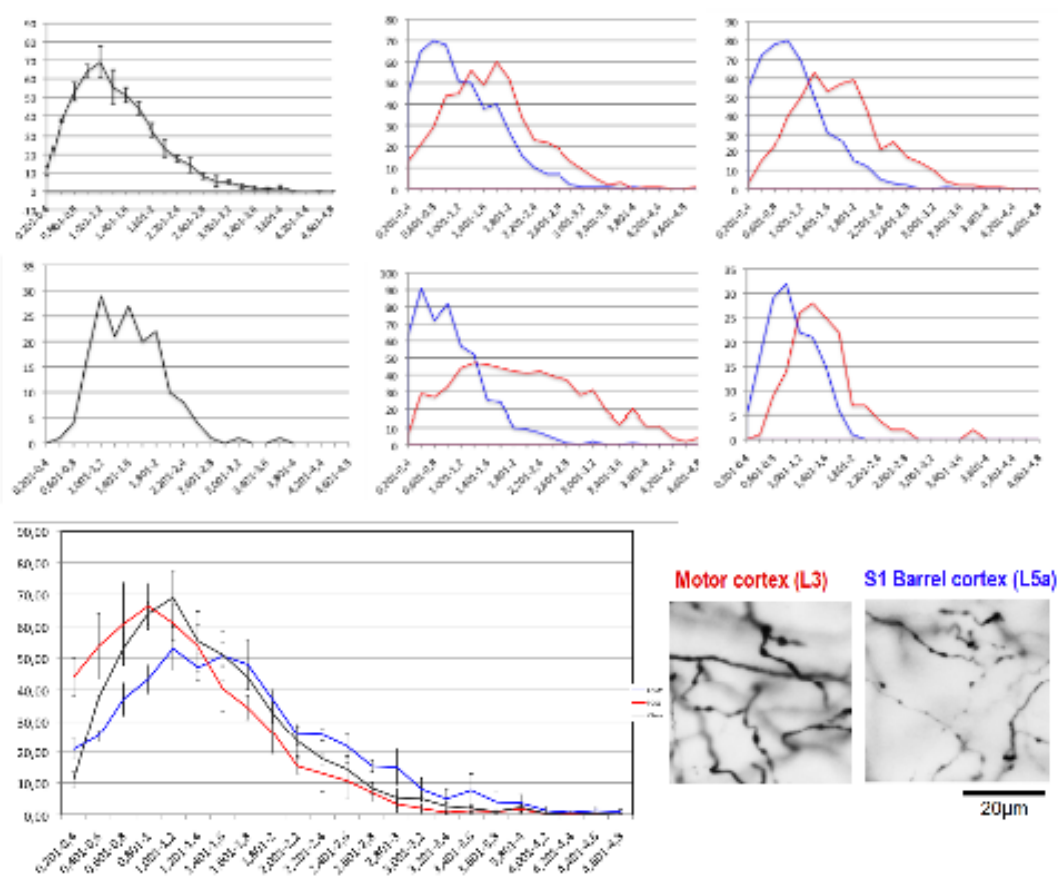


FIGURA 15: Diferencias de tamaños de las varicosidades axónicas de las neuronas del Po en M1 y S1. Las gráficas representan los histogramas con el tamaño de las áreas

DISCUSIÓN

En el presente trabajo aportamos el primer diagrama sistemático y con resolución celular de las conexiones entre un núcleo no-primario del tálamo y las diversas áreas corticales y subcorticales a las que inerva. Para ello, hemos analizado a nivel de micropoblaciones neuronales y de neuronas individuales la arquitectura de los axones ramificados de las neuronas de proyección del núcleo posterior del tálamo (Po) del ratón.

Nuestros datos muestran que los axones de las neuronas de cada punto del Po inervan focalmente varios (2-5) dominios restringidos en la corteza y, con frecuencia, también en el estriado y la amígdala. La localización de dichos dominios corresponde sistemáticamente a aquellas zonas corticales y estriatales en las que estudios previos habían identificado respuestas a la estimulación sensorial de una determinada zona del cuerpo, o evocado movimientos de la misma zona corporal tras microestimulación cerebral. La correspondencia entre cada punto del Po y las distintas áreas corticales y estriatales inervadas por él permite así trazar un mapa hodológico “somatotópico” del núcleo, que, además, es consistente con los estudios publicados de registro electrofisiológico en Po. En conjunto, estas observaciones sugieren que, mediante sus arquitecturas axonales multiespecíficas, las neuronas del Po podrían ser piezas centrales en una colección de redes cortico-talamo-estriatales altamente integradas, cada una preferentemente envuelta en el procesamiento de información sensorimotora de una zona corporal.

Además, nuestros datos muestran que los axones del Po arborizan en láminas diferentes en algunas áreas corticales, e incluso tienen varicosidades de distinto tamaño en unas áreas que en otras. Esto sugiere que la misma información puede alcanzar en cada área poblaciones neuronales específicas y/o regiones dendríticas diferentes de las mismas poblaciones neuronales.

1. CONSIDERACIONES ACERCA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL

Como hemos visto en la introducción, los intentos previos por esclarecer la organización de las proyecciones talamocorticales del Po mediante estudios de trazado anterógrado, retrógrado y de neuronas aisladas resultaron contradictorios o poco concluyentes. Los estudios de trazado anterógrado poblacional, como el realizado por Herkenham (1980) con aminoácidos tritiados o los experimentos más recientes realizados con PHA-L (Ohno y cols., 2011), mostraban un patrón de innervación difuso que no reflejaba los fenotipos axónicos multispecíficos observados en algunos estudios de trazado de neuronas aisladas (Deschenes y cols., 1988; Ohno y cols., 2011). Estos resultados tampoco eran congruentes con el mapa somatotópico de respuestas obtenido por Diamond (1992). Por otra parte, aunque los estudios de trazado retrógrado (Nothias, 1988; Fabri y Burton, 1991) sí sugerían la existencia de cierta somatotopía en las proyecciones del núcleo, el mapa obtenido era poco preciso y tan solo refería las proyecciones a S1. Además, los resultados negativos obtenidos en el único estudio publicado (en rata) que buscó determinar mediante experimentos de doble marcado por transporte axonal retrógrado la prevalencia en Po de neuronas proyectantes a más de un área cortical (Spreafico y cols., 1981) resultaban incongruentes con estudios más recientes de marcado directo de los axones.

En este contexto, el trazado completo de los axones de neuronas aisladas mediante vectores virales parecería el método idóneo para estudiar con precisión los patrones de proyección del núcleo. Sin embargo, y pese a su resolución, este abordaje es poco práctico debido a la dificultad de marcar y reconstruir aisladamente una muestra suficiente de neuronas que, por otra parte, son diversas en cuanto a sus fenotipos axonales y se distribuyen anisotrópicamente dentro del núcleo.

Teniendo en cuenta las ventajas propias de cada uno de estos métodos, decidimos combinarlos en un único estudio, intentando solucionar, en lo posible, sus limitaciones.

En primer lugar, nos propusimos abordar el estudio de las proyecciones del Po mediante el trazado anterógrado con BDA, pero realizando microdepósitos (<200µm diámetro) que nos proporcionasen una resolución de muestreo acorde a la escala del mapa somatotópico del Po del ratón (ver Materiales y Métodos). A diferencia de los resultados obtenidos con depósitos más extensos, las proyecciones de las poblaciones

neuronales marcadas con depósitos pequeños sí reflejaban esta vez los fenotipos axonales multiespecíficos que se habían visualizado en tálamo de la rata.

A continuación, para comprobar en nuestro modelo el grado de correlación entre los patrones de proyección de las poblaciones neuronales marcadas con BDA y los exhibidos por las neuronas a nivel individual, realizamos varios experimentos de trazado de neuronas aisladas en el núcleo con el vector viral Sindbis-palEGFP (Kuramoto et al. 2009). Pese a su potencia, este vector no nos proporcionaba la precisión que necesitábamos en la aplicación controlada para transfectar neuronas (Materiales y métodos). Para solventar este problema, desarrollamos un método de transfección directa del RNA del vector (Porrero y cols, 2016; ver detalles en Materiales y Métodos). Utilizando este método, pudimos transfectar de forma controlada varias neuronas en localizaciones similares a las que habíamos explorado con los depósitos pequeños de BDA. Así pudimos visualizar arquitecturas axónicas que eran congruentes con los patrones de arborización observados mediante los microdepósitos de BDA. Las arquitecturas axonales de estas neuronas aisladas son comparables, en términos generales, con las observadas en la rata (Deschenes y cols., 1988; Ohno y cols., 2011)

Para comprobar de modo global la prevalencia de estos fenotipos axónicos en el núcleo Po, realizamos algunos experimentos de colocalización de trazadores retrógrados. Tal y como explicábamos en la Introducción, esta metodología indirecta es muy proclive a la subestimación aun en el mejor de los casos. De todas formas, y frente a estudios anteriores, partíamos con la ventaja de conocer de antemano y con exactitud los patrones de arborización de los axones de Po en la corteza. En alguno de los casos válidos, observamos marcaje doble o triple en un 30% de las neuronas, un número muy superior al reportado anteriormente (Spreafico y cols. 1987; Macchi). Tomando en cuenta las limitaciones del método de trazado retrógrado y la dificultad de ajustar exactamente la posición de los 2 o tres depósitos con los dominios de arborización, los valores obtenidos son consistentes con la idea de que una mayoría, si no todas, las neuronas del Po proyectan simultáneamente a más de un área. Esta suposición estaba a su vez reforzada por las numerosas colaterales axónicas que observábamos siempre en los experimentos de trazado micropoblacional y de neuronas aisladas.

Además, en otros experimentos de marcado retrógrado exploramos en sentido inverso las conexiones talamocorticales del Po hacia las distintas áreas inervadas desde este

núcleo. Estos datos nos permitieron, conocer la procedencia de la innervación desde Po en algunas áreas corticales que resultaron poco marcadas en los experimentos de transporte axonal anterógrado. Además, nos permitieron objetivar de modo poblacional las diferencias en la innervación de un dominio cortical determinado por parte de neuronas ubicadas en diferentes regiones rostrocaudales dentro del núcleo.

Todo ello permite trazar un mapa detallado y completo de las relaciones hodológicas entre el Po y las diversas áreas corticales y subcorticales que las neuronas de este núcleo innervan mediante sus colaterales axónicas divergentes (Figura 1)

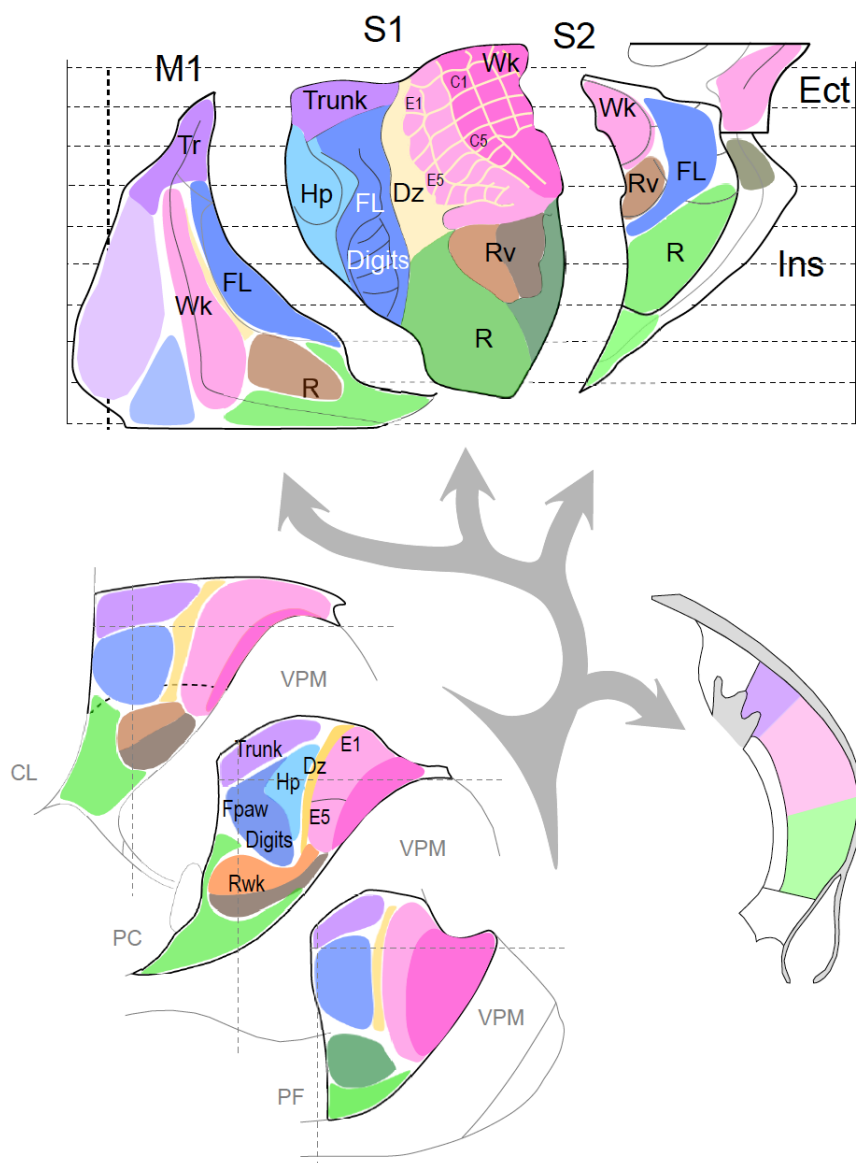


FIGURA 1: Organización de las proyecciones multiespecíficas a la corteza cerebral y al estriado de las neuronas del Po del ratón

2. PATRONES GENERALES DE PROYECCIÓN CORTICAL DE LAS NEURONAS DEL PO

Nuestros estudios de trazado han demostrado que las neuronas del Po proyectan de un modo divergente y selectivo a un mínimo de 2 y un máximo de 5 áreas corticales, entre las cuales siempre se encontraría S1. El resto de áreas inervadas serían M1, S2, Ins, Ect, FrA y M2. En algunos casos, también se observaron proyecciones a PtA y a áreas auditivas asociativas. Este patrón general de inervación coincide, en gran medida, con el observado en la mayoría de las neuronas que se han visualizado de forma aislada en el Po de la rata (Deschenes, 1988; Nosedá, Ohno), al igual que con los patrones obtenidos en muchos de los estudios de trazado poblacional (Herkenham, Ohno). La única diferencia significativa estaría en las proyecciones a las áreas visuales observadas por Nosedá (REF) en algunas de sus neuronas, y por Ohno y cols. (REF) en algunos de sus experimentos de trazado poblacional. Pese al gran número de experimentos de trazado anterógrado y retrógrado realizados, no encontramos ninguna proyección significativa a las cortezas visuales. Sólo tras realizar un gran depósito de Fast Blue en una región extensa de corteza que abarcaba áreas visuales primarias y asociativas, observamos algunas neuronas marcadas en el límite dorsal de Po. La ubicación de estas neuronas nos llevó a considerarlas parte del LP, cuyas proyecciones a las cortezas visuales están bien documentadas (Furuta....). Debido a la ubicación muy dorsal en el núcleo de las neuronas marcadas por Nosedá y de los depósitos de Ohno y cols., no se podría descartar que las neuronas responsables de las proyecciones a las áreas visuales fuesen en realidad del LP. No obstante, también podría tratarse de una diferencia interespecífica existente entre el ratón y la rata.

3. ORGANIZACIÓN SOMATOTÓPICA GENERAL DE LAS PROYECCIONES

El único mapa propuesto hasta la fecha referente a la organización de las proyecciones talamocorticales del Po fue el publicado por Fabri y Burton en 1991. Aunque tres años antes Nothias (1988) ya había sugerido cómo estarían representadas algunas regiones corporales en el núcleo, nunca llegó a reflejarlas en un mapa.

El mapa de Fabri y Burton (1991) sugería la existencia de una organización somatotópica dentro del núcleo que sería la imagen especular de la existente en el complejo ventrobasal. Según este mapa, las regiones trigeminales estarían representadas

en la zona lateral del núcleo, mientras que las espinales lo estarían en las zonas mediales. No obstante, esta representación solo reflejaba la organización de las proyecciones del Po a S1. Un año después, Diamond (1992) publicó otro mapa somatotópico del núcleo en la rata, que hacía referencia en este caso a las respuestas obtenidas mediante la estimulación mecánica de algunas regiones corporales. Este mapa coincidía con el publicado por Fabri y Burton salvo en la representación del tronco, que en lugar de ocupar la zona más dorsal del núcleo estaría interpuesta entre las representaciones de las extremidades. Diamond también representaba con mucho mayor detalle la organización somatotópica de la región trigeminal, incluyendo incluso la localización aproximada de las hileras de vibrisas.

Aunque nuestros resultados son congruentes, en líneas generales, con estos dos mapas previos, la resolución de nuestros métodos de trazado nos ha permitido generar un mapa somatotópico mucho más detallado, que revela una insospechada especificidad en las conexiones del Po. Además, y a diferencia de los trabajos previos, hemos podido determinar como sería este mapa somatotópico en diferentes niveles rostrocaudales del núcleo. Mas importante aún, nuestro mapa no solo refleja la organización de las proyecciones de las neuronas del Po a S1, sino que también refleja la organización somatotópica de sus proyecciones a las cortezas motoras y somestésica secundaria. Es, por lo tanto, el primer mapa somatotópico de proyecciones multiespecíficas que se ha propuesto hasta la fecha.

3.1. Correspondencia del mapa somatotópico del Po con la organización somatotópica de la corteza somatosensorial primaria.

Aunque hemos podido demostrar que las proyecciones del núcleo se distribuyen de acuerdo a un patrón congruente con la representación somatotópica, sensitiva o motora, que estas áreas contienen, han sido las proyecciones a S1 las que nos han permitido desentrañar con mayor precisión el mapa somatotópico existente en el núcleo. Utilizaremos, por lo tanto, el mapa somatotópico de S1 para discutir la representación somatotópica existente en el núcleo.

En consonancia con los mapas previos descritos en la rata, la organización hodológica que hemos observado dentro del Po del ratón es, a grandes rasgos, una imagen especular de la representación somatotópica existente en el complejo ventrobasal.

La representación del territorio trigeminal reflejada en nuestro mapa coincide de forma bastante precisa con la propuesta por Diamond, donde las vibrissas más caudales están representadas dorsalmente y la fila E de barriles en posición medial. En nuestro estudio, hemos podido detectar además la existencia de un gradiente rostrocaudal según el cual las vibrissas más mediales tendrían una mayor representación en los niveles más rostrales del núcleo, mientras que las más laterales estarían más representadas en niveles caudales. Esta organización rostrocaudal recuerda a la observada en los barreloides del compartimento lemniscal del VPM de la rata (Haidarliu y cols., 2008). La representación del resto de la cara se ubicaría, tal y como se había descrito previamente, en la región ventral del núcleo. En nuestro estudio hemos observado, no obstante, que esta representación se extiende algo más por el límite medial del núcleo, ocupando toda su mitad inferior en los niveles más rostrales del éste.

En cuanto a la representación espinal, nuestros resultados sugieren que se encuentra invertida en el eje mediolateral, ubicándose la representación de la extremidad anterior en las regiones más mediales del núcleo. El hecho de que esta representación invertida no haya sido detectada en los estudios previos podría deberse a la menor resolución de los métodos de trazado retrógrado (Nothias, 1988; Fabri y Burton, 1991) o de registro (Diamond, 1992) empleados. La representación del tronco en nuestro estudio ocuparía la franja dorsomedial del núcleo, coincidiendo con la representación de Fabri y Burton.

3.2. Organización de las proyecciones del Po fuera del área S1

Los resultados obtenidos en nuestros experimentos nos han permitido demostrar que las proyecciones del Po se organizan topográficamente en otras áreas distintas a S1. Sin embargo, el sentido de esta organización es menos evidente que en S1, debido a su peor definición y al menor grado de consenso que existe sobre los mapas disponibles en ellas. Pese a estas limitaciones, en base a los mapas anatómo-funcionales que se han propuesto para las cortezas motora y somatosensorial secundaria (ver generación del mapa plano en materiales y métodos), nuestros datos indican la existencia de una distribución somatotópica de las proyecciones del Po en estas áreas.

En la corteza motora, los estudios de microestimulación y de estimulación intracelular que se han venido haciendo en la rata desde los años 70 (Hall y Lindholm, 1974) y, especialmente, los que se han realizado en los últimos años (Mohammed y cols., 2014; Tennant y cols., 2010; Tandon y cols., 2008; Brech y cols., 2004) han permitido disponer de un mapa más o menos detallado de su organización somatotópica. Sin embargo, la distribución espacial de las neuronas cuya microestimulación a baja intensidad produce la activación de determinados grupos musculares del cuerpo es todavía motivo de controversia. En el caso de la corteza que activa el movimiento de las macrovibras, algunos autores han sugerido que está ubicada, junto a las demás representaciones del cuerpo, en la corteza agranular lateral (AGl-M2-) (Donoghue y Wise, 1982; Tennant y cols., 2010). Sin embargo, otros autores la sitúan dentro de la corteza agranular medial (M2) (Neafsey y cols., 1986; Brech y cols., 2004). Nuestros resultados muestran como los axones originados en la región de vibras del Po arborizan en la región medial de la corteza agranular lateral, a lo largo de una franja de corteza orientada rostrocaudalmente que rebasa ligeramente el límite con AGm indicado por Paxinos. En la mayoría de los casos no hallamos un marcado axónico relevante en AGm. Estos resultados parecen confirmar la ubicación de M1wk en AGl, tal y como habían sugerido Donoghue y Wise (1982) y Tennant y cols. (2010).

Al igual que ocurre con las proyecciones del Po a S1, también hemos detectado una distribución somatotópica similar de los axones del Po dentro de M1wk de forma que las neuronas ubicadas en la representación de las vibras más caudales proyectan también a regiones más caudales de M1wk. Aunque también hemos detectado cierta ordenación mediolateral, la falta de resolución espacial en este eje nos ha impedido confirmarlo.

Al igual que ocurre con las proyecciones a la corteza motora desde la representación trigeminal del núcleo, los axones originados en las representaciones espinales también se organizan somatotópicamente en las correspondientes representaciones de las extremidades y del tronco que se encuentran ubicadas en regiones laterales y caudales de M1. En muchos de estos casos, observamos que los axones también arborizaban en una región rostral de AGm. La ubicación de esta zona coincide con la segunda representación motora de la extremidad anterior descubierta por Neafsey y Sievert en la rata (1982). Por último, nuestro análisis de la región espinal del núcleo también sugiere que la representación del tronco en la corteza motora no quedaría restringida

únicamente a la region más caudal de la corteza motora, sino que también se extendería a lo largo de M2. Esto también podría indicar la existencia de una segunda representación del tronco en M2.

Dadas las reducidas dimensiones de S2 y de la corteza insular y ectorrinal en el ratón, resulta más difícil confirmar la existencia de una organización somatotópica de las proyecciones sin disponer de registros electrofisiológicos paralelos. En cualquier caso, la existencia de una organización somatotópica parece clara en el caso de S2, y es congruente con el mapa del área propuesto en el estudio de registro electrofisiológico en ratón de Carvell y Simmons (1987). En la corteza insular, en cambio, tan solo hemos podido demostrar una confluencia de las proyecciones originadas en las region de vibrisas y en la región espinal del núcleo sobre su región más caudal. Dado que en esta región se encontrarían adyacentes dos pequeñas representaciones correspondientes al cuerpo y a la cara (Rodgers y cols., 2008), es posible que ambas proyecciones estén en realidad segregadas, pero que nuestras técnicas de trazado y análisis no tengan la suficiente resolución para discriminarlas. Por otra parte, las proyecciones originadas en las representaciones de la cara proyectarían a la región más rostral de la corteza insular, correspondiente a representaciones de lengua y faringe, entre otras. (Rodgers y cols., 2008)

Un último aspecto a destacar en cuanto a la organización de las proyecciones multiespecíficas del Po es su inervación preferente de determinadas áreas desde determinados niveles rostrocaudales del núcleo. Este hecho ha podido ser constatado en la región laterodorsal del núcleo, correspondiente a la representación de las macrovibrisas. Así, hemos observado que aunque la proyección a S1 se mantenía relativamente constante a lo largo del eje rostrocaudal del núcleo, la proyección a M1 era mucho más profusa en los niveles más rostrales (B -1,58 a B-1,82) , y prácticamente ausente en los más caudales (B -2,30 a B -2,60). De hecho, en las regiones más rostrales del Po los patrones de proyección se asemejan a los descritos para VL (Furuta), núcleo con el que limita. Por el contrario, la proyección a S2 y a las cortezas insular y ectorrinal se origina, predominantemente, en los niveles más caudales del núcleo, tal y como ya habían apuntado otros autores (Spreafico, 1988; Gauriau y Bernard). Por último, en los niveles centrales del núcleo existiría cierto equilibrio entre las tres proyecciones.

3.3. Organización de las proyecciones subcorticales del Po

Las proyecciones del Po al estriado han sido documentadas en varios estudios a nivel poblacional (Smith y cols., 2012; Alloway y cols., 2014) y de neurona única (Deschenes y cols., 1995; Ohno y cols., 2011). Por una parte, Smith y cols. (2012) observaron que las regiones laterales del Po proyectaban de forma más o menos ordenada a regiones caudales del estriado dorsolateral (núcleo putamen), región que recibía, a su vez, proyecciones de la corteza de barriles. Nuestros resultados confirman este hecho, mostrando con mayor detalle la precisa organización de estas proyecciones y, lo que es más importante, permiten correlacionar la organización de las proyecciones en el estriado con la organización de esas mismas proyecciones en las distintas áreas de la corteza cerebral. Además, al documentar también las proyecciones estriatales desde la representación de la cara a regiones ventrales del estriado, demostramos que esta organización topográfica es general en el núcleo. Aunque Alloway y cols. (2014) supusieron que debía existir inervación talamoestriatal desde la representación de la extremidad anterior en el Po a la región correspondiente del estriado (ubicada más rostralmente), nosotros no hemos encontrado una inervación relevante originada en estas regiones del núcleo.

Por otra parte, en base a los resultados obtenidos en sus experimentos de trazado poblacional y de neurona única, Ohno y cols. (2011) propusieron que las proyecciones estriatales del Po se originaban, fundamentalmente, en los niveles más caudales del núcleo. En nuestro caso, no hemos detectado diferencias en cuanto a la mayor o menor inervación del estriado según la ubicación rostrocaudal de los depósitos. La única diferencia observada a este respecto estaba en una ubicación más caudal de las arborizaciones.

Aparte de las proyecciones talamoestriatales, nuestros resultados han demostrado a nivel poblacional y de neurona única la existencia de proyecciones talamoamigdalinas originadas en el Po. Aunque estas proyecciones habían sido descritas previamente en algunos núcleos, auditivos y visuales, del tálamo de la rata (Doron y Ledoux, 1999) no se había documentado su origen en el Po. En cualquier caso, estas proyecciones no parecen ser muy frecuentes y solo se han observado desde representaciones trigeminales del núcleo. En todos los casos, y al igual que en los otros núcleos, los axones arborizaron exclusivamente en el núcleo lateral de la amígdala.

4. PATRONES DE DISTRIBUCIÓN LAMINAR DE LAS PROYECCIONES DEL Po

Además de presentar diferentes patrones de distribución tangencial, nuestros resultados también muestran que las neuronas del Po del ratón pueden presentar diferentes patrones de distribución laminar en las distintas áreas que inervan. Estudios previos de trazado anterógrado poblacional y de neuronas aisladas ya habían demostrado que las neuronas del Po de la rata podían arborizar en diferentes láminas en las distintas áreas corticales (Herkenham, 1980; Deschenes y cols., 1988; Nosedá y cols., 2011; Ohno y cols., 2011). Sin embargo, la heterogeneidad de los resultados obtenidos en los diferentes estudios, y la localización poco precisa de las inyecciones y/o del marcado cortical en algunos de ellos, dificultaba la sistematización de estos patrones. En cualquier caso, la arborización de los axones del Po en la corteza de barriles es, con diferencia, la mejor conocida y más estudiada (Koralek, Lu Lin) (ver introducción). En nuestro estudio, hemos podido trazar las proyecciones de pequeños grupos neuronales, así como de neuronas aisladas, desde localizaciones precisas del núcleo y en toda su extensión. Además, las contrainyecciones de citocromo oxidasa y tiónina, por un lado, y el disponer de un mapa detallado de las áreas corticales, por otro, nos ha permitido delimitar con relativa precisión las diferentes láminas en las diferentes áreas o subáreas corticales.

Nuestros resultados revelan que, generalmente, las neuronas del Po arborizan en la corteza cerebral siguiendo dos patrones laminares distintos de inervación preferente. Por una parte, arborizan en las capas 5a y 1a de las representaciones trigeminales y del tronco de S1 y, por la otra, lo hacen en las capas 4-3 y, en menor medida, también la 5 y la 1 de FrA, M1, S1HL, S2 y las cortezas Insular y Ectorrinal. En S1FL, curiosamente, se han observado ambos tipos de arborizaciones.

En general, los patrones de proyección laminar que hemos observado coinciden con los previamente publicados. De ellos, el más conocido es el de la corteza de barriles. En esta región, siempre se ha propuesto que los axones del Po arborizaban de dos formas distintas: en las capas 5a y 1 de las columnas corticales correspondientes a los barriles, y en la capa 4 de las columnas disgranulares de los septa (Koralek, Lu y Lin, Meyer, Chmielowska y cols., 1989; Kichula y Huntley, 2008). Sin embargo, el examen

cuidadoso de nuestros casos nos lleva a pensar que la innervación preferente de los axones del Po en regiones disgranulares de S1 sería también en las capas 5a y 1 ya que, aunque su abundancia relativa en estas capas parece menor, es en ellas donde parecen ser más varicosos. Por el contrario, la capa 4 parece ser una mera zona de paso preferente de los axones hacia la capa 1, pero no de arborización. Furuta y cols. (2009) han demostrado, no obstante, la innervación de los septa por el VPM. En cualquier caso, sería necesario cuantificar la longitud de axón y el número de varicosidades axónicas en estos compartimentos de S1 para resolver esta cuestión.

Por otra parte, tanto los estudios poblacionales de Herkenham (1988), como los de neuronas individuales de Ohno (2011) coincidían en señalar una arborización preferente de los axones del Po en la capa 3 de la corteza motora primaria de la rata. Aunque hemos encontrado una innervación muy abundante en esta capa, la arborización más profusa se daba en una delgada lámina granular, que se correspondería con la capa 4. Aunque clásicamente se ha considerado a la corteza motora primaria como una corteza agranular, un reciente estudio realizado por el grupo de Shepherd (Yamawaki y cols., 2014) ha demostrado la existencia de una capa 4 genuina en la corteza motora primaria del ratón, así como su innervación por parte del Po.

Este mismo patrón de innervación encontrado en M1, con una arborización axonal profusa en las capas 4 y 3, resultó ser muy similar al observado en la región de S1 correspondiente a la representación de la extremidad posterior (S1HL), así como al observado en algunas zonas de S1FL. Coincidiría, además, con el de alguna de las neuronas publicadas por Ohno y cols. (2011). La similitud en los patrones de innervación de estas áreas motoras y somestésicas podría explicarse por la existencia de un solapamiento entre las representaciones motora y somestésica de las extremidades en esta región de la corteza. Este solapamiento ha sido demostrado en diversos estudios (Hall y Lindholm, 1974; Donogue y Wise, 1982; Tennant y cols., 2011)

Otra de las áreas corticales donde hay cierta controversia en cuanto a su innervación por parte del Po es S2. Aunque una parte de los estudios coinciden en señalar una innervación predominante de la capa 4, similar a la que recibe S1 desde el VPM (Herkenham, Nosedá, Víaene), otros estudios han documentado la existencia de proyecciones del Po a las capas 5 y 1 (Deschenes, Ohno). Nosotros hemos observado, tanto a nivel poblacional como de neurona individual, que casi todas las regiones del Po

proyectan a las capas 5a, 4, 3 y 1, siendo las proyecciones a las capas 5a y 1 menos abundantes que las encontradas en S1. Para poder precisar las diferencias existentes entre la innervación de las distintas capas sería conveniente realizar, en este caso, un estudio cuantitativo. Por último, sí hemos observado claramente que las proyecciones a las regiones más rostrales de S2 (donde se incluirían las representaciones de la cara con excepción de las macrovibras y de las vibras rostrales) terminan en las capas 5a y 1, de forma similar a como lo hacen en S1BF. Estas diferencias en los patrones laminares de innervación de S2 podrían estar reflejando diferencias funcionales relativas al discutido carácter primario o asociativo de esta corteza en los roedores (Jones, 2007; Liao y Yen, 2008).

Por último, Ohno y cols. (2011) han propuesto que las regiones rostrales del Po proyectan predominantemente a la capa 5a, mientras que las posteriores lo hacen a la capa 1. Nosotros no hemos encontrado tales diferencias en la mayor parte del núcleo, aunque es cierto que en las regiones muy caudales, que incluirían la porción triangular, sí hemos observado proyecciones a capa 1 mucho más extensas. En cualquier caso, las observaciones de Ohno y cols. podrían estar sesgadas al incluir en su estudio una mayoría de neuronas muy caudales.

5. DIFERENCIAS EN EL TAMAÑO DE LAS VARICOSIDADES AXONALES

Además de la correlación encontrada entre las varicosidades axonales y las sinapsis en las proyecciones talamocorticales del ratón (White, 2004), estudios recientes también han demostrado una correlación entre el tamaño de las varicosidades y el perfil de los EPSPs que genera (Revisión en Petrof y Sherman, 2013). Así, las varicosidades grandes ($> 2\mu\text{m}$ de sección transversal) se asocian a EPSPs grandes y a una depresión por pares de pulsos. Estas varicosidades suelen encontrarse en axones gruesos que contactan con dendritas próximas a soma. Por el contrario, las varicosidades pequeñas se asocian a EPSPs pequeños y a la facilitación por pares de pulsos. Estas varicosidades se encuentran en axones finos, y suelen contactar con dendritas distales. Según la clasificación de las vías glutamatérgicas propuesta por Sherman, las varicosidades grandes se encontrarían en vías de Clase 1, de carácter directiz, mientras que las pequeñas se

encontrarían en vías de clas 2, de carácter modulador. En un estudio reciente (Viaene y cols), encontraron que el tamaño de las varicosidades de las proyecciones del Po en la capa 4 de S2 era significativamente mayor que en la capa 5a de S1. Las proyecciones a S2 serían, por lo tanto, directrices de la actividad cortical en esta zona, mientras que las proyecciones a S1 tendrían un carácter modulador. En nuestros experimentos observamos de forma repetida un aparente mayor grosor de los axones y de sus varicosidades en las proyecciones del Po a la capa 3-4 de M1 que contrastaba con las finas ramas y pequeñas varicosidades observadas en la capa 5 de S1. Las mediciones realizadas en S1 y en M1 de una muestra amplia de varicosidades en tres casos distintos demostraron que, tal como sospechábamos, las varicosidades en M1 eran significativamente mayores que en S1. Estas diferencias de tamaño correlacionaban, a su vez, con unos patrones laminares distintos.

6. CONSIDERACIONES FUNCIONALES

Como habíamos expuesto en la introducción, la diversidad funcional de las neuronas talámicas, y por extensión del tálamo, se puede explicar en base a las diversas arquitecturas conectivas de sus axones. Así, la transmisión precisa y topográfica a la corteza cerebral de la información procedente de los receptores periféricos es posible gracias a la arborización densa, focal y unívoca de los axones de las NTP específicas en las corteza primarias. Mientras que la activación sincrónica de extensas regiones corticales ante estímulos intensos es posible gracias a las arborizaciones extensas y difusas de los axones de las NT inespecíficas.

En los últimos años, se ha propuesto que el tálamo podría estar desempeñando funciones mucho más complejas que no podrían explicarse en base a las características de los axones específicos e inespecíficos. Estas funciones tendrían relación con la génesis de procesos cognitivos y atencionales (Kastner). Se ha sugerido, por una parte, que las conexiones que mantiene el núcleo pulvinar del tálamo de primates con dos áreas visuales extraestriadas pueden regular, en tareas atencionales, el flujo de información entre esas dos áreas mediante la sincronización de sus oscilaciones de membrana en determinadas frecuencias (Saalmann y cols., 2012). Por otra parte,

algunos modelos computacionales (Vicente y cols., 2008) también sugieren que el tálamo ocuparía un papel central en la sincronización a tiempo cero de poblaciones neuronales espacialmente segregadas.

En este contexto, los resultados obtenidos en nuestro estudio adquieren una especial relevancia, ya que muestran como los axones de las neuronas del Po emiten varias ramas colaterales que recorren la sustancia blanca cortical para acabar innervando, de forma precisa y organizada, distintos dominios corticales y subcorticales segregados espacialmente, pero integrados funcionalmente en una misma red sensorimotora (Diamond, 2013; Petersen..). Las arquitecturas axonales y la organización de estas neuronas las sitúa en una posición privilegiada para regular flujo de información entre áreas motoras y somestésicas mediante la sincronización de las oscilaciones de membrana. El problema sería explicar cómo un mismo estímulo podría alcanzar de forma simultánea regiones distantes, como es el caso de las cortezas motora e insular. Tal y como sugirieron Salami y cols. (2003), esto sería posible si, durante todo su recorrido subcortical, los axones permaneciesen mielinizados, ya que su velocidad de conducción sería entonces independiente de la distancia. El hecho de que las distintas colaterales perdiesen la mielina una vez que entrasen en la corteza no sería relevante, puesto que las distancias que recorrerían en ella durante su trayecto vertical serían más o menos las mismas. Nuestros resultados revelan que, en la mayoría de los casos, los axones discurren mielinizados por la sustancia blanca antes de emitir la correspondiente colateral. En algunos casos, no obstante, hemos observado que los axones recorren largas distancias en la capa 6 antes de arborizar en la región correspondiente. Estudiar la existencia de heterogeneidades en el grado de mielinización de los axones sería fundamental para determinar como están transmitiendo la información a las distintas áreas. Por último, también sería interesante determinar si la activación sensorial y el bloqueo de la transmisión en el tálamo genera efectos distintos y/o sincrónicos entre las áreas corticales innervadas.

CONCLUSIONES

1. Las neuronas del Po proyectan de modo divergente y selectivo a un mínimo de 2 y un máximo de 5 áreas corticales que incluyen siempre el área somatosensorial primaria. En cada una de estas áreas las colaterales axónicas de una misma neurona inervan siempre las mismas representaciones somatotópicas.
2. Dentro del Po, las neuronas se disponen siguiendo gradientes sistemáticos relacionados con la somatotopía que existe en el núcleo, de forma que la ubicación de las neuronas en el plano coronal determinará sus proyecciones a diferentes representaciones somatotópicas de las áreas inervadas. Así, las neuronas ubicadas en la región dorsolateral proyectan a las representaciones de vibrisas, las ubicadas en posición ventral lo hacen a la representación de las regiones más rostrales de la cara, las ubicadas en la región medial lo harán a las representaciones de las extremidades y las dorsomediales a las representaciones del tronco.
3. Las representaciones trigeminales de la corteza reciben inervación de las zonas más laterales en el núcleo. Por el contrario, la conexión somatotópica de las regiones espinales está invertida en el eje mediolateral
4. Según sea su localización en el eje rostrocaudal, las neuronas de la región dorsolateral del núcleo proyectan de forma distinta a las distintas áreas inervadas, de forma que las neuronas mas rostrales proyectan preferentemente a las cortezas motoras, mientras que las más caudales lo hacen a las áreas somatosensorial secundaria, insular y/o ectorrinal. A su vez, en la corteza de barriles, los barriles más mediales recibirían más inervación de los niveles más rostrales.
5. Los niveles más caudales del núcleo, y en especial su división triangular, proyectan de forma escasa a S1 y de forma más difusa al resto de áreas inervadas
6. Además de inervar la corteza cerebral, La mayoría de las neuronas ubicadas en regiones dorsolaterales, dorsomediales y ventrales del núcleo proyectan focal y somatotópicamente a regiones laterales, mediales y ventrales, respectivamente, del estriado dorsolateral. Sin embargo, las neuronas localizadas en la región medial

del núcleo apenas inervan el estriado. En caso de hacerlo, las arborizaciones son muy poco profusas y se localizan en regiones más rostrales.

8. Algunas neuronas ubicadas en las regiones ventral y dorsolateral del Po inervan el núcleo lateral de la amígdala

9. La distribución laminar de las ramas colaterales de un mismo axón varía entre áreas corticales. Así, en las representaciones trigeminales y del tronco de S1, en algunas regiones de S1FL y en las regiones más rostrales de S2, los axones del Po arborizan predominantemente en la capa 5a y 1.

10. En la corteza motora primaria, en S1HL, en algunas regiones de S1FL, en las representaciones espinales y de las vibrisas de S2 y en las cortezas insular y ectorrinal, los axones del Po arborizan preferentemente en las capas 3-4, y en mucha menor medida en las capas 5a y 1. En la corteza agranular medial (M2) los axones arborizan principalmente en la capa 1.

11. El tamaño de las varicosidades axónicas de un mismo axón varía entre áreas corticales. Así, el tamaño de las varicosidades de las ramas axónicas que arborizan en las capas 3-4 dentro de la representación de las vibrisas en M1 es significativamente mayor que el de las varicosidades de las ramas que arborizan en S1BF.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC: Complejo avidina-biotina	FB: Fast Blue
AGl: Corteza agranular lateral	FG: Fluoro Gold
AGm: Corteza agranular medial	FL: Extremidad anterior
AID: Corteza insular agranular dorsal	FO: Primer orden
AIP: Corteza insular agranular posterior	Fr1: Corteza frontal, área 1
AIV: Corteza insular agranular ventral	Fr2: Corteza frontal, área 2
Amg: Amígdala	FrA: Corteza frontal de asociación
AP: Anteroposterior	GABA: Ácido gamma-amino butírico
Au: Corteza auditiva	GFP: Proteína verde fluorescente
Au1: Corteza auditiva primaria	GI: Corteza insular granular
AuD: Corteza auditiva dorsal	HBP: Human Brain Project
AuV: Corteza auditiva ventral	HL: Extremidad posterior
AV: Núcleo anterior ventral	HO: Orden superior
BDA: Amino dextrano biotinilado	HRP: “Horseradish peroxidase”
BF: Región del campo de barriles	IAM: Núcleo interanteromedial
BHK: <i>Baby hamster kidney</i>	IC: Cápsula interna
BSA: Albúmina de suero bovino	IL: Intralaminar
CB: Calbindina	INS: Corteza insular
CeL: Núcleo central lateral	J: Región de la mandíbula
CeM: Núcleo central medial	L: Capa cortical
Cg1: Corteza cingulada, área 1	LD: Núcleo lateral dorsal
Cg2: Corteza cingulada, área 2	LIPS: Sistema proyectante a capa 1
CIMA: Centro de Investigación Médica Aplicada	Lm: Línea media
CL: Núcleo central lateral	LP: Núcleo lateral posterior
CMc: Núcleo centromediano, parte “core”	LPM: División medial del núcleo lateral posterior
CM–Pf: Núcleo centro mediano–parafascicular	LPtA: Corteza parietal de asociación lateral
CTB A488: Subunidad B de la cólera-toxina asociado a Alexa 488.	M1: Corteza motora primaria
CTB A594: Subunidad B de la cólera-toxina asociado a Alexa 594	M2: Corteza motora secundaria
CTB: Subunidad B de la cólera-toxina	MD: Núcleo mediodorsal
Cx: Corteza	MGD: Núcleo geniculado medial, división dorsal
DAB: 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorhídrico	MGM: Núcleo geniculado medial, división medial
DCl: Claustro dorsal	MGV: Núcleo geniculado medial, división ventral
DI: Corteza insular disgranular	MPtA: Corteza parietal de asociación medial
DLG: Núcleo geniculado laterodorsal	n: Número de animales
DY: Diamidino yellow	NaCl: Cloruro sódico
Ect: Corteza entorrinal	NGM: Núcleo geniculado medial
Elm: Lámina medular externa	NTC: Neuronas tálamo-corticales
EPSPs: Potenciales postsinápticos excitatorios	NTPs: Neuronas talámicas de proyección
F: Cara	P2: Segundo prosómero
	PB: Tampón fosfato

PBS: Tampón fosfato salino
 Pc: Núcleo paracentral
 Pf: Núcleo parafascicular
 PFA: Paraformaldehído
 PHA-L: Leucoaglutinina de Phaseolus vulgaris
 Pir: Corteza piriforme
 Po: Núcleo posterior
 Poc: Núcleo posterior, porción caudal
 Poi: Núcleo posterior, subdivisión intermedia
 Pol: Núcleo posterior, subdivisión lateral
 Pom: Núcleo posterior, subdivisión medial
 PoT: Núcleo posterior, división triangular
 Pr: Protocolo
 PRh: corteza perirrinal
 Pt: Núcleo paratenial
 PtA: Corteza parietal de asociación
 PtPR: Corteza parietal posterior rostral
 Pu: Complejo pulvinar
 PVA: Núcleo anterior paraventricular
 Re: Núcleo reuniens
 RNA: Ácido ribonucleico
 RpTN: Núcleo reticular pretalámico
 RSA: Corteza agranular retrosplenial
 RSD: Corteza disgranular retrosplenial
 RSGb: Corteza retroesplenial granular b
 S1: Corteza somatosensorial primaria
 S1BF: Corteza somatosensorial primaria, zona de barriles
 S1DZ: Corteza somatosensorial primaria, zona disgranular
 S1FL: Corteza somatosensorial primaria, región de la extremidad anterior
 S1Head: Corteza somatosensorial primaria, zona de la cabeza
 S1HL: Corteza somatosensorial primaria, región de la extremidad posterior
 S1J: Corteza somatosensorial primaria, región mandibular
 S1RV: Corteza somatosensorial primaria, región de las vibrisas rostrales
 S1Sh: Corteza somatosensorial primaria, región del hombro
 S1Tr: Corteza somatosensorial primaria, región del tronco
 S1ULp: Corteza somatosensorial primaria, región del labio superior
 S2: Corteza somatosensorial secundaria
 SDL: Región dorsolateral del estriado
 Sg: Núcleo supragenicolado
 Sh: Región del hombro
 SNR: Sustancia negra reticulada
 Spf: Núcleo subparafascicular
 STR: Estriado
 TC: Proyecciones tálamo-corticales
 TeA: Corteza asociativa temporal
 TMR: Tetrametilrodamina
 TNE: Tampón Tris NaCl EDTA
 TR: Tronco
 TX: Tritón
 ULp: Región del labio superior
 V1: Corteza visual primaria
 V1B: Corteza visual primaria binocular
 V1M: Corteza visual primaria monocular
 V2L: Corteza visual secundaria, área lateral
 V2ML: Corteza visual secundaria, área mediolateral
 V2MM: Corteza visual secundaria medial medial
 VA: Núcleo ventral anterior
 VB: Núcleo ventrobasal
 VL: Núcleo ventral lateral
 VM: Núcleo ventromedial
 VP: Núcleo ventral posterior
 VPL: Núcleo ventroposterolateral
 VPM: Núcleo ventroposteromedial
 VPMdm: Núcleo ventroposteromedial, región dorsomedial
 VPMvl: Núcleo ventroposteromedial, región ventrolateral
 W: Vibrisas
 WGA: Aglutinina de germen de trigo
 Wk: Vibrisas
 WM: Sustancia blanca subcortical
 Ziv: Zona incerta ventral

BIBLIOGRAFÍA

Ahissar E, Oram T. Thalamic relay or cortico-thalamic processing? Old question, new answers. *Cereb Cortex*. 2015 Apr; 25(4):845-8.

Alloway KD, Smith JB, Watson GD. Thalamostriatal projections from the medial posterior and parafascicular nuclei have distinct topographic and physiologic properties. *J Neurophysiol*. 2014 Jan; 111(1):36-50.

Arbuthnott GW, MacLeod NK, Maxwell DJ, Wright AK. Distribution and synaptic contacts of the cortical terminals arising from neurons in the rat ventromedial thalamic nucleus. *Neuroscience* 1990; 38(1): 47-60.

Arcelli P, Frasconi C, Regondi MC, De Biasi S, Spreafico R. GABAergic neurons in mammalian thalamus: a marker of thalamic complexity? *Brain Res Bull* 1997; 42: 27-37.

Avendaño C, Rausell E, Reinoso-Suarez F. Thalamic projections to areas 5a and 5b of the parietal cortex in the cat: a retrograde horseradish peroxidase study. *J Neurosci*. 1985 Jun; 5(6):1446-70.

Avendaño C, Stepniewska I, Rausell E, Reinoso-Suárez F. Segregation and heterogeneity of thalamic cell populations projecting to superficial layers of posterior parietal cortex: a retrograde tracer study in cat and monkey. *Neuroscience* 1990; 39: 547-59.

Barthó P, Freund TF, Acsády L. Selective GABAergic innervation of thalamic nuclei from zona incerta. *Eur J Neurosci*. 2002 Sep; 16(6):999-1014.

Berendse HW, Groenewegen HJ. Restricted cortical terminations fields of the midline and intralaminar thalamic nuclei in the rat. *Neuroscience* 1991; 42: 73-102.

Berkley KJ. Response properties of cells in ventrobasal and posterior group nuclei of the cat. *J Neurophysiol*. 1973 Sep; 36(5):940-52.

Bruno, RM, Sakmann, B. Cortex is driven by weak but synchronously active thalamocortical synapses. *Science* 2006; 312, 1622–1627.

Calma I. The activity of the posterior group of thalamic nuclei in the cat. *J Physiol*. 1965 Sep; 180(2):350-70.

Carvell GE, Simons DJ. Thalamic and corticocortical connections of the second somatic sensory area of the mouse. *J Comp Neurol*. 1987 Nov 15; 265(3):409-27.

Casey KL. Unit analysis of nociceptive mechanisms in the thalamus of the awake squirrel monkey. *J Neurophysiol*. 1966 Jul; 29(4):727-50.

Cebrián C, Parent A, Prensa L. Patterns of axonal branching of neurons of the substantia nigra pars reticulata and pars lateralis in the rat. *J Comp Neurol*. 2005 Nov 21; 492(3):349-69.

Chmielowska J, Carvell GE, Simons DJ. Spatial organization of thalamocortical and corticothalamic projection systems in the rat SmI barrel cortex. *J Comp Neurol*. 1989 Jul 15; 285(3):325-38.

- Curry MJ. The exteroceptive properties of neurones in the somatic part of the posterior group (PO). *Brain Res.* 1972a Sep 29; 44(2):439-62.
- Curry MJ. The effects of stimulating the somatic sensory cortex on single neurones in the posterior group (PO) of the cat. *Brain Res.* 1972b Sep 29; 44(2):463-81.
- Curry MJ, Gordon G. The spinal input to the posterior group in the cat. An electrophysiological investigation. *Brain Res.* 1972 Sep 29; 44(2):427-37.
- Desbois C, Villanueva L. The organization of lateral ventromedial thalamic connections in the rat: a link for the distribution of nociceptive signals to widespread cortical regions. *Neuroscience.* 2001; 102(4):885-98.
- Deschenes M, Bourassa J, Doan VD, Parent A. A single-cell study of the axonal projections arising from the posterior intralaminar thalamic nuclei in the rat. *Eur J Neurosci* 1996; 8: 329-43.
- Deschenes M, Bourassa J, Parent A. Two different types of thalamic fibers innervate the rat striatum. *Brain. Res.* 1995; 701: 288-92.
- Deschenes M, Veinante P, Zhang ZW. The organization of corticothalamic projections: reciprocity versus parity. *Brain Res Brain Res Rev.* 1998 Dec; 28(3):286-308.
- Diamond ME, Arabzadeh E. Whisker sensory system - from receptor to decision. *Prog Neurobiol.* 2013 Apr; 103:28-40.
- Diamond ME, Armstrong-James M, Budway MJ, Ebner FF. Somatic sensory responses in the rostral sector of the posterior group (POm) and in the ventral posterior medial nucleus (VPM) of the rat thalamus: dependence on the barrel field cortex. *J Comp Neurol.* 1992a May 1; 319(1):66-84.
- Diamond ME, Armstrong-James M, Ebner FF. Somatic sensory responses in the rostral sector of the posterior group (POm) and in the ventral posterior medial nucleus (VPM) of the rat thalamus. *J Comp Neurol.* 1992b Apr 22; 318(4):462-76.
- Donoghue JP, Wise SP. The motor cortex of the rat: cytoarchitecture and microstimulation mapping. *J Comp Neurol.* 1982 Nov 20; 212(1):76-88.
- Doron NN, Ledoux JE. Organization of projections to the lateral amygdala from auditory and visual areas of the thalamus in the rat. *J Comp Neurol.* 1999 Sep 27; 412(3):383-409.
- Fabri M, Burton H. Topography of connections between primary somatosensory cortex and posterior complex in rat: a multiple fluorescent tracer study. *Brain Res.* 1991 Jan 11; 538(2):351-7.
- Frangéul L, Porrero C, García-Amado M, Maimone B, Maniglier M, Clascá F, Jabaudon D. Specific activation of the paralemniscal pathway during nociception. *Eur J Neurosci.* 2014 May; 39(9):1455-64.
- Frontera JG. Some results obtained by electrical stimulation of the cortex of the island of Reil in the brain of monkey (*Macaca mulatta*). *J Comp Neurol* 1956; 105: 365-394.
- Furuta T, Kaneko T, Deschenes M. Septal neurons in barrel cortex derive their receptive field input from the lemniscal pathway. *J Neurosci.* 2009 Apr 1; 29(13):4089-95.

- Furuta T, Tomioka R, Taki K, Nakamura K, Tamamaki N, Kaneko T. In vivo transduction of central neurons using recombinant sindbis virus: Golgi-like labeling of dendrites and axons with membrane-targeted fluorescent proteins. *J. Histochem. Cytochem.* 2001; 49, 1497–1507.
- Gauriau C, Bernard JF. Posterior triangular thalamic neurons convey nociceptive messages to the secondary somatosensory and insular cortices in the rat. *J Neurosci.* 2004 Jan 21; 24(3):752-61.
- Groh A, Bokor H, Mease RA, Plattner VM, Hangya B, Stroh A, Deschenes M, Acsády L. Convergence of cortical and sensory driver inputs on single thalamocortical cells. *Cereb Cortex.* 2014 Dec; 24(12):3167-79.
- Haidarliu S, Yu C, Rubin N, Ahissar E. Lemniscal and Extralemniscal Compartments in the VPM of the Rat. *Front Neuroanat.* 2008 Sep 12; 2:4.
- Hand PJ, Morrison AR. Thalamocortical projections from the ventrobasal complex to somatic sensory areas I and II. *Exp Neurol.* 1970 Feb; 26(2):291-308.
- Heath CJ. Distribution of axonal degeneration following lesions of the posterior group of thalamic nuclei in the cat. *Brain Res.* 1970 Jul 29; 21(3):435-8.
- Heath CJ, Jones EG. An experimental study of ascending connections from the posterior group of thalamic nuclei in the cat. *J Comp Neurol.* 1971 Apr; 141(4):397-426.
- Hendry SH, Jones EG, Graham J. Thalamic relay nuclei for cerebellar and certain related fiber systems in the cat. *J Comp Neurol.* 1979 Jun 15; 185(4):679-713.
- Herkenham M. The connections of the nucleus reuniens thalami: evidence for a direct thalamo-hippocampal pathway in the rat. *J Comp Neurol* 1978; 177: 568-610.
- Herkenham M. The afferent and efferent connections of the ventromedial thalamic nucleus in the rat". *J Comp Neurol* 1979; 183: 487-517.
- Herkenham M. Laminar organization of thalamic projections to the rat neocortex. *Science* 1980; 207: 532-5.
- Herkenham M. New perspectives on the organization and evolution of nonspecific thalamocortical projections. *En Cerebral Cortex Vol 5*, Jones EG, Peters A (eds.) New York, Plenum; 1986; 403-445.
- Horikawa K, Armstrong WE. A versatile means of intracellular labeling: injection of biocytin and its detection with avidin conjugates. *J Neurosci Methods.* 1988 Aug; 25(1):1-11.
- Hunnicut B, Long BR, Kusefoglu D, Gertz KJ, Zhong H, Mao T. A comprehensive thalamocortical projection map at the mesoscopic level. *Nat Neurosci.* 2014 Sep; 17(9):1276-85.
- Jankowska E, Rastad J, Westman J. Intracellular application of horseradish peroxidase and its light and electron microscopical appearance in spinocervical tract cells. *Brain Res.* 1976 Apr 9; 105(3):557-62.
- Jasper H. Diffuse projection systems: the integrative action of the thalamic reticular system. *Electroencephalogr Cin Neurophysiol* 1949; 1: 405-20.

- Jasper H. Functional properties of the thalamic reticular system. En: *Brain Mechanisms and Consciousness*. 1954. Delafesnaye (ed). París, Masson, pp: 374-401.
- Jones EG. A new view of specific and nonspecific thalamocortical connections. *Adv Neurol* 1998a; 77: 49-71.
- Jones EG. Viewpoint: the core and matrix of thalamic organization. *Neuroscience* 1998b ; 85: 331-45.
- Jones EG. The thalamic matrix and thalamocortical synchrony. *Trends Neurosci* 2001; 24: 595-601.
- Jones EG. Thalamic circuitry and thalamocortical synchrony. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2002; 357: 1659-73.
- Jones EG. *The Thalamus*. Second ed. 2007. Cambridge University Press, New York.
- Jones EG, Leavitt RY. Demonstration of thalamo-cortical connectivity in the cat somatosensory system by retrograde axonal transport of horseradish peroxidase. *Brain Res*. 1973 Dec 7; 63:414-8.
- Kichula EA, Huntley GW. Developmental and comparative aspects of posterior medial thalamocortical innervation of the barrel cortex in mice and rats. *J Comp Neurol*. 2008 Jul 20; 509(3):239-58.
- Kishan AU, Lee CC, Winer JA. Branched projections in the auditory thalamocortical and corticocortical systems. *Neuroscience* 2008; 154:283–293.
- Koralek KA, Jensen KF, Killackey HP. Evidence for two complementary patterns of thalamic input to the rat somatosensory cortex. *Brain Res*. 1988 Nov 1; 463(2):346-51.
- Krubitzer LA, Kaas JH. The somatosensory thalamus of monkeys: cortical connections and a redefinition of nuclei in marmosets. *J Comp Neurol*. 1992 May 1; 319(1):123-40.
- Kuramoto E, Furuta T, Nakamura KC, Unzai T, Hioki H, Kaneko T. Two types of thalamocortical projections from the motor thalamic nuclei of the rat: a single neuron-tracing study using viral vectors. *Cereb Cortex*. 2009 Sep; 19(9):2065-77. Erratum in: *Cereb Cortex*. 2012 Nov; 22(11):2703.
- Kuramoto E, Ohno S, Furuta T, Unzai T, Tanaka YR, Hioki H, Kaneko T. Ventral medial nucleus neurons send thalamocortical afferents more widely and more preferentially to layer 1 than neurons of the ventral anterior-ventral lateral nuclear complex in the rat. *Cereb Cortex*. 2015 Jan; 25(1):221-35.
- Lavallée P, Urbain N, Dufresne C, Bokor H, Acsády L, Deschênes M. Feedforward inhibitory control of sensory information in higher-order thalamic nuclei. *J Neurosci*. 2005 Aug 17; 25(33):7489-98.
- Le Gros Clark WE. The structure and connections of the thalamus. *Brain* 1932; 55: 406-70.
- Lee CC, Sherman SM. Synaptic properties of thalamic and intracortical inputs to layer 4 of the first- and higher-order cortical areas in the auditory and somatosensory systems. *J Neurophysiol*. 2008 Jul; 100(1):317-26.

- Liao CC, Yen CT. Functional connectivity of the secondary somatosensory cortex of the rat. *Anat Rec (Hoboken)*. 2008 Aug; 291(8):960-73.
- Llinás RR, Steriade M. Bursting of thalamic neurons and states of vigilance. *J Neurophysiol* 2006; 95: 3297-3308.
- Lorente de Nó R. La corteza cerebral del ratón (primera contribución – la corteza “acústica”). *Trab Lab Inv Biol Univ Mad* 20: 41-78. Reimpresión traducida al inglés en *Somatosens Mot Res* 9 1992; 3-36.
- Lorente de Nó R. The cerebral cortex: architecture, intracortical connections and motor projections. En: *The Physiology of the Nervous System*, Fulton JF (Ed). 1938. Oxford University Press: Oxford, London pp. 291-340.
- Lu SM, Lin RC. Thalamic afferents of the rat barrel cortex: a light- and electron-microscopic study using *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin as an anterograde tracer. *Somatosens Mot Res*. 1993; 10(1):1-16.
- Macchi G. Old and new anatomo-functional criteria in the subdivision of the thalamic nuclei. En *Somatosensory Integration in the Thalamus*. Macchi G, Rustoni A, Spreafico R (Eds.). 1983. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, pp:3-15.
- Macchi G, Bentivoglio M, Minciacchi D, Molinari M. Claustroneocortical projections studied in the cat by means of multiple retrograde fluorescent tracing. *J Comp Neurol*. 1983 Apr 1; 215(2):121-134.
- Masri R, Trageser JC, Bezdudnaya T, Li Y, Keller A. Cholinergic regulation of the posterior medial thalamic nucleus. *J Neurophysiol*. 2006 Nov; 96(5):2265-73.
- Matsuda W, Furuta T, Nakamura KC, Hioki H, Fujiyama F, Arai R, Kaneko T. Single nigrostriatal dopaminergic neurons form widely spread and highly dense axonal arborizations in the neostriatum. *J Neurosci*. 2009 Jan 14; 29(2):444-53.
- McFarland NR, Lee JS, Hyman BT, McLean PJ. Comparison of transduction efficiency of recombinant AAV serotypes 1, 2, 5, and 8 in the rat nigrostriatal system. *J Neurochem*. 2009 May; 109(3):838-45.
- Meyer HS, Wimmer VC, Oberlaender M, de Kock CP, Sakmann B, Helmstaedter M. Number and laminar distribution of neurons in a thalamocortical projection column of rat vibrissal cortex. *Cereb Cortex*. 2010 Oct; 20(10):2277-86.
- Mohammed H, Jain N. Two whisker motor areas in the rat cortex: evidence from thalamocortical connections. *J Comp Neurol*. 2014 Feb 15; 522(3):528-45.
- Monconduit L, Villanueva L. The lateral ventromedial thalamic nucleus spreads nociceptive signals from the whole body surface to layer I of the frontal cortex. *Eur J Neurosci* 2005; 21: 3395-402.
- Morison RS, Dempsey EW. A study of thalamo-cortical relations. *Am J Physiol* 1942a ; 135: 281-92.
- Morison RS, Dempsey EW. Mechanism of thalamocortical augmentation and repetition. *Am J Physiol* 1942b ; 135: 301-8

- Murray KD, Choudary PV, Jones EG. Nucleus- and cell-specific gene expression in monkey thalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007; 104, 1989–1994.
- Nakagawa Y, Shimogori T. Diversity of thalamic progenitor cells and postmitotic neurons. *Eur. J. Neurosci.* 2012; 35, 1554–1562.
- Nakamura H, Hioki H, Furuta T, Kaneko T. Different cortical projections from three subdivisions of the rat lateral posterior thalamic nucleus: a single-neuron tracing study with viral vectors. *Eur J Neurosci.* 2015 May; 41(10):1294-310.
- Nashold BS, Hanbery J, Olszewski J. Observations on the diffuse thalamic projections. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1955 Nov; 7(4):609-20.
- Neafsey EJ, Bold EL, Haas G, Hurley-Gius KM, Quirk G, Sievert CF, Terreberry RR. The organization of the rat motor cortex: a microstimulation mapping study. *Brain Res.* 1986 Mar; 396(1):77-96.
- Neafsey EJ, Sievert C. A second forelimb motor area exists in rat frontal cortex. *Brain Res.* 1982 Jan 28; 232(1):151-6.
- Nosedá R, Constandil L, Bourgeois L, Chalus M, Villanueva L. Changes of meningeal excitability mediated by corticotrigeminal networks: a link for the endogenous modulation of migraine pain. *J Neurosci.* 2010 Oct 27; 30(43):14420-9.
- Nosedá R, Jakubowski M, Kainz V, Borsook D, Burstein R. Cortical projections of functionally identified thalamic trigeminovascular neurons: implications for migraine headache and its associated symptoms. *J Neurosci.* 2011 Oct 5; 31(40):14204-17.
- Nothias F, Peschanski M, Besson JM. Somatotopic reciprocal connections between the somatosensory cortex and the thalamic Po nucleus in the rat. *Brain Res.* 1988 Apr 26; 447(1):169-74.
- Ohno S, Kuramoto E, Furuta T, Hioki H, Tanaka YR, Fujiyama F, Sonomura T, Uemura M, Sugiyama K, Kaneko T. A morphological analysis of thalamocortical axon fibers of rat posterior thalamic nuclei: a single neuron tracing study with viral vectors. *Cereb Cortex.* 2012 Dec; 22(12):2840-57.
- Ottersen OP, Fischer BO, Storm-Mathisen J. Retrograde transport of D-[3H]aspartate in thalamocortical neurones. *Neurosci Lett.* 1983 Nov 21; 42(1):19-24.
- Parent M, Parent A. Single-axon tracing and three-dimensional reconstruction of centre median-parafascicular thalamic neurons in primates. *J. Comp. Neurol.* 2005; 481, 127–144.
- Paxinos G, Franklin KBJ. The mouse brain in stereotaxis coordinates. Second edition. 2001. San Diego: Academic Press.
- Perl ER, Whitlock DG. Somatic stimuli exciting spinothalamic projections to thalamic neurons in cat and monkey. *Exp Neurol.* 1961 Mar; 3:256-96.
- Petreaanu L, Mao T, Sternson SM, Svoboda K. The subcellular organization of neocortical excitatory connections. *Nature* 2009; 457, 1142–1145.
- Petrof I, Sherman SM. Functional significance of synaptic terminal size in glutamatergic sensory pathways in thalamus and cortex. *J Physiol.* 2013 Jul 1; 591(13):3125-31.

Pinault D. A novel single-cell staining procedure performed in vivo under electrophysiological control: morpho-functional features of juxtacellularly labeled thalamic cells and other central neurons with biocytin or Neurobiotin. *J Neurosci Methods* 1996; 65: 113-36.

Poggio GF, Mountcastle VB. A study of the functional contributions of the lemniscal and spinothalamic systems to somatic sensibility. *Central nervous mechanisms in pain. Bull Johns Hopkins Hosp.* 1960 May; 106:266-316.

Porrero C, Rodríguez-Moreno J, Quetglas J, Smerdou C, Furuta T, Clascá F. A Simple and Efficient In Vivo Non-viral RNA Transfection Method for Labeling the Whole Axonal Tree of Individual Adult Long-Range Projection Neurons. *Front Neuroanat.* 2016 Mar 18; 10:27.

Prensa L, Parent A. The nigrostriatal pathway in the rat: A single-axon study of the relationship between dorsal and ventral tier nigral neurons and the striosome/matrix striatal compartments. *J Neurosci.* 2001 Sep 15; 21(18):7247-60.

Puelles L, Rubenstein JL. Forebrain gene expression domains and the evolving prosomeric model. *Trends Neurosci.* 2003 Sep; 26(9):469-76.

Rausell E, Jones EG. Extent of intracortical arborization of thalamocortical axons as a determinant of representational plasticity in monkey somatic sensory cortex. *J Neurosci* 1995; 15: 4270-88.

Rieck RW, Carey RG. Organization of the rostral thalamus in the rat: evidence for connections to layer I of visual cortex. *J Comp Neurol* 1985; 234: 137-54.

Rodgers KM, Benison AM, Klein A, Barth DS. Auditory, somatosensory, and multisensory insular cortex in the rat. *Cereb Cortex.* 2008 Dec; 18(12):2941-51.

Rose JE, Woolsey CN. Organization of the mammalian thalamus and its relationships to the cerebral cortex. *EEG Clin Neurophysiol* 1949; 1: 391-404.

Rowe MJ, Sessle BJ. Somatic afferent input to posterior thalamic neurones and their axon projection to the cerebral cortex in the cat. *J Physiol.* 1968 May; 196(1):19-35.

Rubio-Garrido P, Pérez de Manzo F, Porrero C, Galazo MJ, Clasca F. Thalamic input to apical dendrites in neocortical layer 1 is massive and highly convergent. *Cereb. Cortex* 2009; 19, 2380–2395.

Saalmann YB, Pinsk MA, Wang L, Li X, Kastner S. The pulvinar regulates information transmission between cortical areas based on attention demands. *Science.* 2012 Aug 10; 337(6095):753-6.

Salami M, Itami C, Tsumoto T, Kimura F. Change of conduction velocity by regional myelination yields constant latency irrespective of distance between thalamus and cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 May 13; 100(10):6174-9.

Schofield BR, Schofield RM, Sorensen KA, Motts SD. On the use of retrograde tracers for identification of axon collaterals with multiple fluorescent retrograde tracers. *Neuroscience.* 2007 May 11; 146(2):773-83.

Sherman SM and Guillery RW. Exploring the thalamus and its role in cortical function. 2006. Cambridge (UK): MIT Press.

Sherman SM. Thalamocortical interactions. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2012; 22, 575–579.

- Shibata H. Efferent projections from the anterior thalamic nuclei to the cingulate cortex in the rat. *J Comp Neurol* 1993a; 330: 533-42.
- Shibata H. Direct projections from the anterior thalamic nuclei to the retrohippocampal region in the rat. *J Comp Neurol* 1993b; 337: 431-45.
- Smith JB, Mowery TM, Alloway KD. Thalamic POm projections to the dorsolateral striatum of rats: potential pathway for mediating stimulus-response associations for sensorimotor habits. *J Neurophysiol*. 2012 Jul; 108(1):160-74.
- Sobolewski A, Kublik E, Swiejkowski DA, Kamiński J, Wróbel A. Alertness opens the effective flow of sensory information through rat thalamic posterior nucleus. *Eur J Neurosci*. 2015 May; 41(10):1321-31.
- Spreafico R, Hayes NL, Rustioni A. Thalamic projections to the primary and secondary somatosensory cortices in cat: single and double retrograde tracer studies. *J Comp Neurol*. 1981 Nov 20; 203(1):67-90.
- Spreafico R, Barbaresi P, Weinberg RJ, Rustioni A. SII-projecting neurons in the rat thalamus: a single- and double-retrograde-tracing study. *Somatosens. Res*. 1987; 4, 359–375.
- Steward O. Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat. *J Comp Neurol* 1976; 167: 285-314.
- Szwed M, Bagdasarian K, Ahissar E. Encoding of vibrissal active touch. *Neuron*. 2003 Oct 30; 40(3):621-30.
- Tandon S, Kambi N, Jain N. Overlapping representations of the neck and whiskers in the rat motor cortex revealed by mapping at different anaesthetic depths. *Eur J Neurosci*. 2008 Jan; 27(1):228-37.
- Tennant KA, Adkins DL, Donlan NA, Asay AL, Thomas N, Kleim JA, Jones TA. The organization of the forelimb representation of the C57BL/6 mouse motor cortex as defined by intracortical microstimulation and cytoarchitecture. *Cereb Cortex*. 2011 Apr; 21(4):865-76.
- Theyel B, Lee CC, Sherman SM. Specific and nonspecific thalamocortical connectivity in the auditory and somatosensory thalamocortical slices. *Neuroreport*. 2010 Sep 15; 21(13):861-4.
- Theyel B, Llano D and Sherman SM. The corticothalamocortical circuit drives higher-order cortex in the mouse. *Nature Neuroscience* 2010; 13:84-88.
- Trageser JC, Burke KA, Masri R, Li Y, Sellers L, Keller A. State-dependent gating of sensory inputs by zona incerta. *J Neurophysiol*. 2006 Sep; 96(3):1456-63.
- Trageser JC, Keller A. Reducing the uncertainty: gating of peripheral inputs by zona incerta. *J Neurosci*. 2004 Oct 6; 24(40):8911-5.
- Urbain N, Deschenes M. A new thalamic pathway of vibrissal information modulated by the motor cortex. *J Neurosci*. 2007 Nov 7; 27(45):12407-12.
- Van Groen T, Kadish I, Wyss JM. Efferent connections of the anteromedial nucleus of the thalamus of the rat. *Brain Res Brain Res Rev* 1999; 30: 1-26.

- Van Groen T, Wyss JM. Projections from the laterodorsal nucleus of the thalamus to the limbic and visual cortices in the rat. *J Comp Neurol* 1992; 324: 427-48.
- Veinante P, Deschenes M. Single-cell study of motor cortex projections to the barrel field in rats. *J Comp Neurol*. 2003 Sep 8; 464(1):98-103.
- Veinante P, Jacquin MF, Deschenes M. Thalamic projections from the whisker-sensitive regions of the spinal trigeminal complex in the rat. *J Comp Neurol*. 2000 May 1; 420(2):233-43.
- Viaene AN, Petrof I, Sherman SM. Properties of the thalamic projection from the posterior medial nucleus to primary and secondary somatosensory cortices in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2011 Nov 1; 108(44):18156-61.
- Vicente R, Gollo LL, Mirasso CR, Fischer I, Pipa G. Dynamical relaying can yield zero time lag neuronal synchrony despite long conduction delays. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2008 Nov 4; 105(44):17157-62.
- Walker AE. The thalamus in relation to the cerebral cortex. *J Nerv Ment Dis* 1937; 85:249-261.
- Waller WH. Topographical relations of cortical lesions to thalamic nuclei in the albino rat. *J Comp Neurol* 1934; 60: 237-269.
- White EL, Weinfeld E, Lev DL. Quantitative analysis of synaptic distribution along thalamocortical axons in adult mouse barrels. *J Comp Neurol*. 2004 Nov 1; 479(1):56-69.
- Whitlock DG, Perl ER. Thalamic projections of spinothalamic pathways in monkey. *Exp Neurol*. 1961 Mar; 3:240-55.
- Wimmer VC, Bruno RM, de Kock CP, Kuner T, Sakmann B. Dimensions of a projection column and architecture of VPM and POm axons in rat vibrissal cortex. *Cereb Cortex*. 2010 Oct; 20(10):2265-76.
- Wouterlood FG, Saldaña E, Witter MP. Projection from the nucleus reuniens thalami to the hippocampal region: light and electron microscopic tracing study in the rat with the anterograde tracer Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 1990; 296(2): 179-203.
- Yamawaki N, Borges K, Suter BA, Harris KD, Shepherd GM. A genuine layer 4 in motor cortex with prototypical synaptic circuit connectivity. *Elife*. 2014 Dec 19; 3:e05422.
- Yu C, Horev G, Rubin N, Derdikman D, Haidarliu S, Ahissar E. Coding of object location in the vibrissal thalamocortical system. *Cereb Cortex*. 2015 Mar; 25(3):563-77.
- Zucker E, Welker WI. Coding of somatic sensory input by vibrissae neurons in the rat's trigeminal ganglion. *Brain Res*. 1969 Jan; 12(1):138-56.